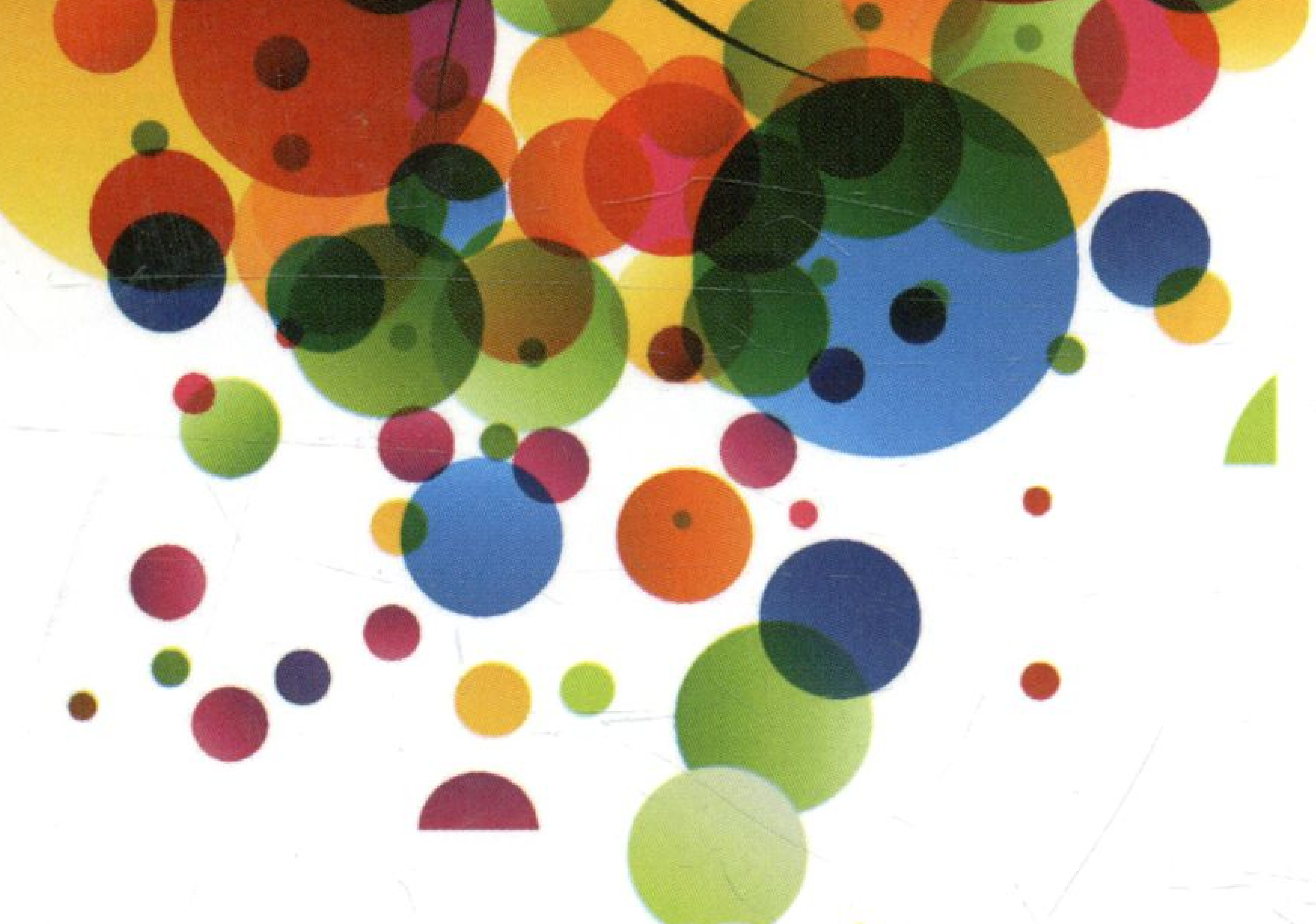


دور بعض المعززات العلاجية والمستخلصات النباتية في التثبيط البكتيري

مروه حسن عبد الوهاب الصميدعي

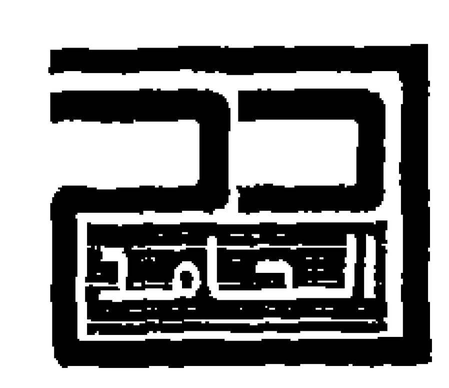
الحامد

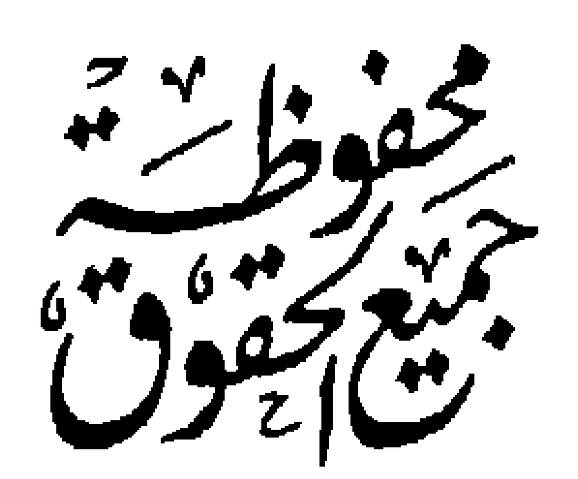


دور بعض المعززات العلاجية والمستخلصات النباتية في التثبيط البكتيري

دور بعض المعززات العلاجية والمستخلصات النباتية في التثبيط البكتيري

مروه حسن عبد الوهاب الصميدعي





رقـــم التصنيـــــــف : 633.88

المؤلف ومن هــو في حكمه : مروه حسن الصميدعي

عنـــوان الكتـــــاب : دور بعض المعززات العلاجية والمستخلصات النباتية في التثبيط البكتيري

رقـــم الإيــــداع : 2013/1/258

الواصفـــــــــات : /النباتات الطبية//الامراض//العلاج/

بيـــانـــات الناشـــر : عمان – دار ومكتبة الحامد للنشر والتوزيع

يتحمل المؤلف كامل المسؤولية القانونية عن محتوى مصنفه ولا يعبّر هذا المصنف عن رأي دائرة المكتبة الوطنية أو أي جهة حكومية أخرى.

ISBN 978-9957-32-741-5 (ردمك)

تم إعداد بيانات الفهرسة والتصنيف الأولية من قبل دائرة المكتبة الوطنية.

الطبعة الأولى 2013-1434هـ



دار الحامد للنشر والتوزيع

الأردن - عمان - شفا بدران - شارع العرب مقابل جامعة العلوم التطبيقية

هاتف: 5231081 6 962+ فاكس : 5235594 6 962+

ص.ب . (366) الرمز البريدي: (11941) عمان – الأردن

www.daralhamed.net

E-mail : daralhamed@yahoo.com

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿شَهِدَ اللّهُ أَنَّهُ لاَ إِلَـهَ إِلاَّ هُوَ وَالْمَلاَئِكَةُ وَأُوْلُواْ الْعِلْمِ قَآئِمَاً بِالْقِسْطِ لاَ إِلَـهَ إِلاَّ هُوَ الْعَزِيزُ الْحَكِيمُ ﴾

آل عمران الآية (18)

الإهداء

إلى من سقياني الحنان ورعياني وسهرا علي

والدي الحبيبين

إلى من وقفوا إلى جانبي ودعموني

اخواني وأخواتي

إلى ملاك دنياي ومحط أنظاري

زوجي الغالي

إلى ابنتي سما زهرة من زهور الدنيا

إلى كافة الزملاء والزميلات

اهدي جهدي المتواضع هذا

مروة

الشكر والتقدير

الحمد لله الذي رفع من شاء إلى ما يشاء والصلاة والسلام على سيدنا محمد وعلى اله وصحبه ومن والاه وبعد.

يسعدني والرسالة قد بلغت نهايتها ان أتوجه بخالص شكري وتقديري وعظيم امتناني للأستاذ الدكتور كركز محمد ثلج لتفضله باقتراح موضوع الرسالة وإشرافه على البحث ولتوجيهاته القيمة وسعة صدره ومتابعته المستمرة وتعاونه منقطع النظير لإعداد هذه الرسالة ويوفقه الله مثلما جعله السبب في ما أنا فيه والذي كان المنهل العذب الذي نهلت من علمه الغزير الذي كان له الأثر البالغ في خروج هذه الدراسة المتواضعة إلى نور الكلمة المشرفة والنبيلة والمشرقة فجزاه الله عني خير الجزاء.

وأتوجه بعظيم الشكر والتقدير إلى الأستاذ الدكتور علي صالح حسين رئيس جامعة تكريت لرعايته المستمرة لكافة الطلبة وطلبة الدراسات العليا. والفضل لا يوفيه شكراً لمن غمرني بأفضاله فكل الشكر والثناء والتقدير إلى عمادة كلية التربية واخص منهم بالذكر رئيس وأساتذة قسم علوم الحياة لتذليلهم الصعوبات التي اعترضت طريق البحث واخص منهم الدكتور برهان الدليمي والدكتور صالح العبيدي والدكتور عبد الله الجبوري والدكتور محمد نضير كما أقدم شكري وتقديري إلى عمادة كلية الزراعة قسم علوم الأغذية والتقنات الاحيائية لإتاحتهم الفرصة لإتمام جزء من العمل في مختبراتهم.

وافر شكري وامتناني لعمادة كلية العلوم واخص منهم بالذكر قسم علوم الحياة كل من الدكتور عزيز خالد والدكتور زيد محمد مبارك والدكتور وعد محمود رؤوف والدكتور موسى محمد جاسم والدكتور عواد شعبان للدكتور غزوان حسن والأخ الدكتور خالد عكاب والأخ الدكتور فياض عبد والأخ الأستاذ احمد شاكر الجنابي والسيد عدنان الدليمي لجهودهم المبذولة خلال فترة دراستي.

وعرفاناً بالجميل يسرني أن أقدم شكري إلى الدكتور نهاد الدوري(رحمه الله) لتعاونه وحثه المستمر لي للتوجه إلى الدراسات العليا، والى الغائبة الحاضرة الأخت براء عايد (رحمها الله).

اصدق معاني الامتنان أقدمها إلى زملائي طلبة الدراسات العليا على المواقف الصادقة المبذولة واخص بالذكر شيماء، نوره، عبد الخالق، أنور، محمد، قاسم، وقاص، والى موظفي وموظفات المكتبة المركزية في جامعة تكريت لما قدموه من تعاون في حقل الدراسة.

كما أقدم باقة من الورد محملة بكل الثناء والود والاحترام إلى المقومين (العلمي واللغوي) للدراسة والسادة رئيس وأعضاء لجنة المناقشة لأمانتهم في إخراج هذه الدراسة إلى النور وهي تحمل في طياتها سلامة الفكر واللغة واجعل مسك ختام شكري أقدم عظيم شكري وامتناني إلى عائلتي والدي الغاليين وزوجي وطفلتي وأخوتي والعم يونس وأولاده وعائلته الكريمة وجميع الأهل وكل من أسدى إلي معروفاً فلهم مني جزيل الشكر والتقدير، وأؤكد أن أجمل آيات الشكر والعرفان لا تكفي بل أحس ان العبارة في ورقتي المتواضعة تعجز عن إيفاء كل ذي حق حقه فالذي قدموه كثير وما قمت به هو اقل من ان يوصف، وقد أتى الله عباده العلم على درجات وفوق كل ذي علم عليم.

مروه

قائمة المحتويات

قائمة الجداول


الفصل الأول
المقدمة

تعد بكتريا *Streptococcus pyogenes* من أنواع البكتريا المهمة الممرضة للإنسان والمنتشرة بشكل واسع في جميع أنحاء العالم وذلك لقابليتها في إحداث الكثير من الأمراض كالتهاب الفم واللوزتين والتي قد ينتج عنها استجابة مناعية غير طبيعية التي يمكن ان تتسبب في حدوث بعض الأمراض مثل الحمى الروماتزمية (Rheumatic Fever) والتهاب الكلية الحاد . (Hookey *et al*., 1996).

تدخل هذه البكتريا إلى الجسم من خلال مداخل متعددة أهمها المجرى التنفسي العلوي الذي يسبب التهاب اللوزتين البلعومي المسبحي ومن خلال الجلد حيث تؤدي إلى حدوث بعض الإصابات الجلدية لاسيما في المناطق الحاره مثل التقيح الجلدي ويمكن ان تدخل عبر القناة التناسلية الأنثوية حيث تسبب التهاب المهبل وحمى النفاس (Johnson *et al*., 1996).

بالنظر لقلة فاعلية المضادات الحيوية المستخدمة في علاج هذه الأنواع المايكروبية الممرضة فضلاً عن ارتفاع التأثيرات الجانبية للمضادات المستخدمة في علاجها (Beaulac 1998 ,)، فقد اتجهت الأنظار إلى محاولة استخدام المعززات العلاجية أو المستخلصات النباتية في تثبيط فاعلية أو قتل الأنواع المايكروبية الممرضة.

ان من ضمن المعززات العلاجية الأكثر استخداماً هي أنواع من بكتريا حامض اللاكتيك لاسيما النوعين *Lactobacillus acidophilus* و *Bifidobacterium bifidum* اذ يعد النوع *Lb. acidophilus* من أشهر أنواع العصيات اللبنية المستخدمة كمعزز علاجي حيث انه ينتمي إلى المجموعة غير متجانسة التخمر (Tissier, 1996).

كون هذه العصيات غير مرضية ولا تنتج السموم و ذات فائدة صحية ، حيث انها تتواجد في الأمعاء كجزء من النبيت الطبيعي (Normal flora) (Ishibushi and Yamazaki 2001)، و كذلك فانها تتمكن من إنتاج الحامض عندما توجد في المهبل مسببة في الحد من نمو الفطريات من النوع *Candida albicans* والحال نفسه في الإصابات المعدية المعوية (Cotter and Hill, 2003).

اما النوع *B. bifidum* الذي يمتاز بأشكاله المتباينة بين عصيات منحنية إلى عصيات Club-shabed rods وعصيات على شكل حرفY

(Hadadji *et al.,* 2005) فقد تم عزلها لأول مره من قبل العالم Heny Tisser وذلك اثناء قيامه بفحص براز الاطفال المعتمدين على الرضاعة الطبيعية وان نسبة هذه العصيات في القناة المعوية للانسان تشكل الغالبية العظمى حيث يمكن ان تصل إلى 99٪ من محتواها من النبت الطبيعي. (Tisser, 1900).

ان آلية عمل أنواع بكتريا حامض اللاكتيك المستخدمة كمعززات علاجية لمنع الإصابة بالإسهال أو الحالات المرضية هي من خلال قابليتها على إنتاج المواد المثبطة للممرضات مثل البكتريوسينات و الاحماض العضوية و H_2O_2 بالإضافة إلى قيامها بغلق موقع الارتباط لأنواع المايكروبات المرضية وسمومها مع الخلايا الطلائية فضلاً عن فاعليتها في تعديل الاستجابة المناعية للمضيف (Mack and Label, 2003).

كذلك استخدمت المستخلصات النباتية في علاج أكثر الحالات المرضية الناتجة من الأنواع المايكروبية المرضية وان من أهمها استخداماً هي مستخلصات بذور الحبة السوداء والتي تبين بأن فاعليتها التثبيطية ضد المايكروبات المرضية تكون من احتوائها على المكون الرئيس Saponin وكذلك احتوائها على القلويدات باشكال النيجليلامين والنيجلسين وما يسمى بالنجلون Nigellone والثايمول التي تمتلك فضلاً عما ذكر تأثيرات في تحسين الجهاز المناعي للانسان عند استخدامها لما يكون لها تأثير غير مباشر في التثبيط الميكروبي (Abo-Basha *et al.,* 1995).

اما مستخلص من بذور نبات الكلغان الذي يحتوي على المركبات الفلافونية Flavonoids بشكل مركب يعرف بـ Silymarin الذي يعد المسؤول عن الفعالية العلاجية لمستخلص بذور النبات (Bisset, 1994) وكذلك الحال مع مستخلص اوراق الشاي الأخضر الذي تبين بأنه يحتوي على تراكيز مرتفعة من الفينولات المتعددة (Polyphenols) التي تمتاز بانها مضادات للأكسدة فضلا عن احتوائها على السكريات المتعددة (Polysaccharides) والفلافونيدات (Flavonids) ومجموعة من الفيتامينات من C و B و E و A(Grham, 1992).

ان فاعلية المستخلصات اعلاه لاسيما كمضادات بكتيرية يمكن استخدامها في علاج حالات التسمم الغذائي وكذلك في تثبيط المايكروبات المسببة لنخز الأسنان

والتخمرات غير المرغوبة في الفم مثل *Streptococcus* sp و *E. coli* وغيرها من الأنواع البكتيرية الممرضة الأخرى (Hara, 1989 و Rasheed, 1998).

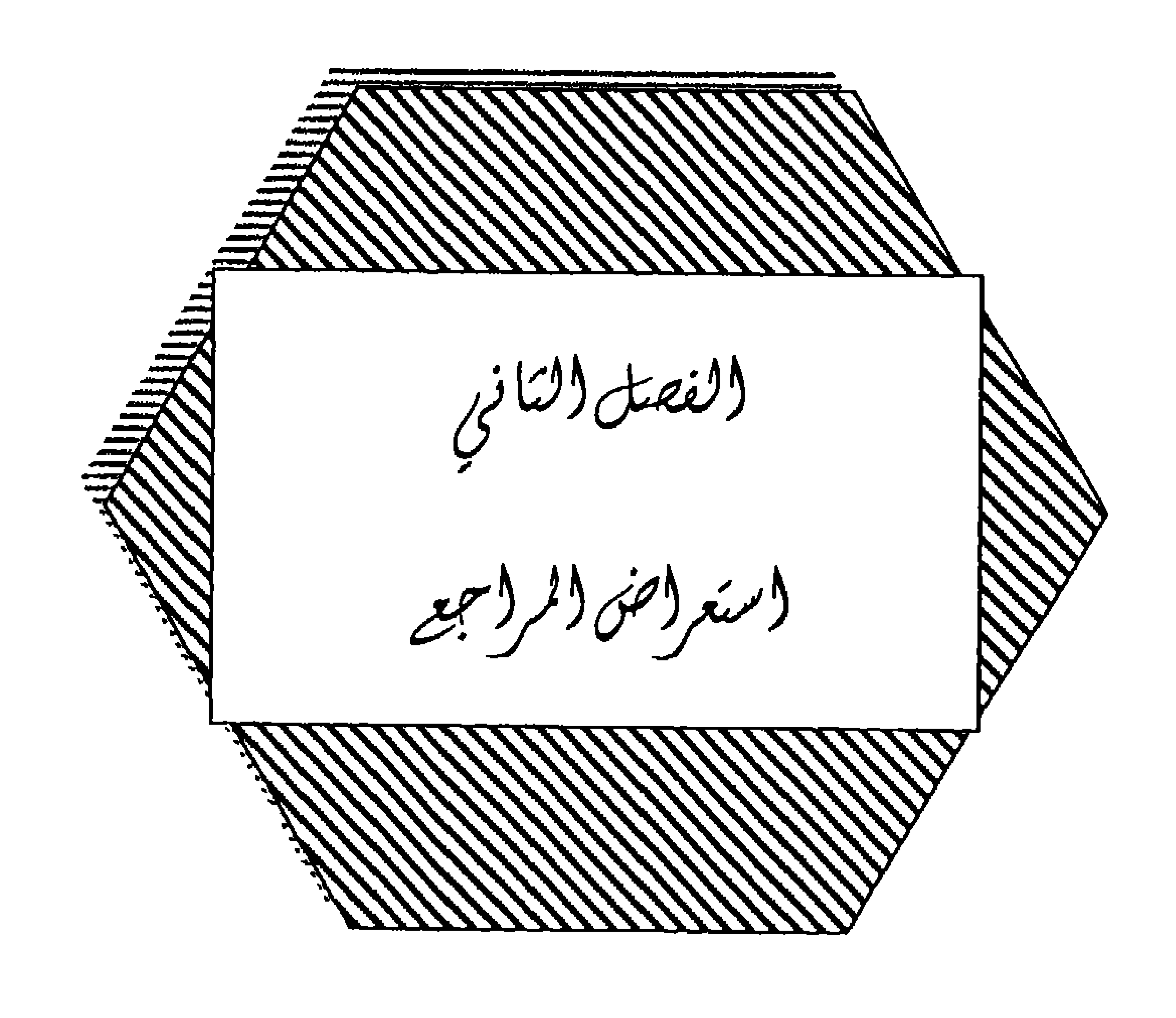
ومما تقدم فان هدف الدراسة كان الآتي :

1- عزل وتشخيص عزلتين من لنوع *Streptococcus pyogenes* من إصابات في الفم والبلعوم.

2- دراسة بعض العوامل المؤثرة في النمو وإنتاج الستربتولايسين O في هذه البكتريا.

3- دراسة تأثير التداخل ما بين هذه الأنواع أو متأيضاتها بتراكيز متسلسلة في تثبيط النمو و أنتاج الستربتولايسين O من قبل عزلتي *S. pyogenes*، وكذلك عزل وتشخيص أنواع من بكتريا حامض اللاكتيك من المنتجات اللبنية.

4- دراسة فاعلية المستخلصات النباتية بتراكيز متعددة في تثبيط النمو وانتاج الستربتولايسين O من قبل عزلتي *S. pyogenes* وكذلك بيان محتوى المستخلصات المائية من بذور الحبة السوداء والكلغان وأوراق الشاي الأخضر من المركبات الفعالة فيها.


الفصل الثاني
استعراض المراجع

2- استعراض المراجع:

2- 1- المكورات المسبحية *Streptococcus pyogenes*

2- 1- 1 نبذة تاريخية

تم وصف بكتريا *Streptococcus pyogenes* لأول مرة من قبل العالم Billroth وذلك في عام (1874) حيث تم عزلها من حالات احمرار الجلد (Erysipelas) والتهاب الجروح، وقد وجدت بأنها كائنات مجهريه كروية أو بيضوية تنمو في سلاسل (Davis *et al.*, 1990).

في عام (1879) تم عزلها من امرأة مصابة بحمى النفاس (Puerperal Fever) من قبل العالم باستور (Pastur). و كذلك تم عزلها في مزروع نقي (Pure Culture) من تقرحات الجلد من قبل العالم Fehlesen عام (1883) حيث اثبت أن هذه الكائنات يمكن إن تنتج التقيحات المحمرة (Typicale erysipelas) في الإنسان. وفي سنة 1884 تمكن من عزلها العالم Resenbach من آفات قيحية (Suppurative) وأطلق عليها الاسم العلمي *Streptococcus pyogenes* والذي يعني المكورات القيحية (Parker, 1984 and Mandell *et al.*, 1995).

تم تصنيف بكتريا *S. pyogenes* ضمن أنماط مصليه (Serotypes) اعتماداً على البروتين السطحي للجدار الخلوي بروتين M والذي يُعُد أهم عامل من عوامل الضراوة في مختلف هذه البكتريا والمسؤول عن خصوصية النمط (Type Specificity). إذ يوجد أكثر من 120 نمط البروتين M، والتي لم يتم تشخيص ألا 80 نمط مصلي منها بالطرق المصلية وسميت من (M1 إلى M80) بالطرق المصلية (Ahmed and Ayoub, 1998).

2- 1- 2 الصفات العامة لـ Streptococcus:

تتصف أنواع الجنس Streptococcus بانها موجبة لصبغة كرام كروية أو بيضوية الشكل تنقسم في مستوى واحد بشكل عمودي على محور السلسلة مما ينتج أزواجاً أو سلاسل مختلفة الطول (Brooks *et al.*, 1998) وقطر الخلايا يبلغ اقل

من (0.2) مايكرون ولكنها يمكن أن تتطاول وتظهر بشكل عصوي تحت ظروف خاصة (Starr *et al.*, 1981). تنمو معظم أنواعها بصورة لاهوائية اختيارية (Faculative anerobic) مع ان بعضها ينمو لاهوائياً إجبارياً (Strict anaerobic) مثل النوع Pepto *Streptococcus putrida* كما تتصف بأنها غير مكونة للسبورات، غير متحركة و تحتوي عادة على المحفظة وتظهر نمواتها في المزارع القديمة سالبة لصبغة كرام وتحتاج إلى أوساط زرعيه غنية لكي تنمو بشكل جيد ومن أهم أنواعها هو *Streptococcus pyogenes* (Johnson *et al.*, 1996).

2- 1- 3 الصفات العامة للنوع *Streptococcus pyogenes*:

2- 1- 3- 1 الصفات المظهرية

تتصف *S. pyogenes* بأنها موجبة لصبغة كرام، كروية أو بيضوية وذات قطر يتراوح 0.7- 0.9 مايكرون (Collee *et al.*, 1996)، تنتظم خلاياها بشكل أزواجاً أو سلاسل مختلفة الطول (Rotta, 1986) يعتمد طول السلسلة على العزلة والوسط الزرعي المستخدم للتنمية. فقد وجد ان بعض العزلات تكون بشكل سلاسل طويلة جداً لاسيما عندما تنمو في الوسط السائل وعندما يكون مدعما بالمصل أو الدم. فضلاً عما ذكر فأنها غير متحركة وغير مكونة للسبورات وتمتلك محفظة يكون مكونها الرئيس حامض الهيالورونيك (Holt *et al.*, 1994).

2- 1- 3- 2 الصفات الزرعية والكيموحيوية

تظهر مستعمرات النوع البكتيري *S. pyogenes* عند تنميتها على وسط اكار الدم بإحجام صغيرة جدا تكون ما يشبه رأس الدبوس، وتكون ذات لون ابيض أو شفافة، محدبة، محاطة بمناطق من التحلل الكامل نوع بيتا، أما درجة الحرارة المثالية لنموها فهي 37^{o}م، ويتراوح الأس الهيدروجيني المثالي لها بين 7.4 الى 7.6 ويمكن زيادة معدل نمو العديد من عزلات النوع من خلال اختزال توفر الأوكسجين أو بزيادة مستوى غاز CO_2 (Joklik *et al.*, 1992). تكون هذه البكتريا لاهوائية اختيارية، قدرتها على النمو في الأوساط الزرعية الاعتيادية ضعيفة لذلك تستعمل الأوساط المعقدة المدعمة بالدم أو المصل لاسيما للعزل الأولي (Belli *et al.*, 1984).

ان ظهور مستعمراتها على الوسط الصلب يكون بثلاثة أشكال رئيسة مخاطية (Mucoid)، مجعدة (Malt) أو لماعة (Glossy) وهي سالبة لفحصي الاوكسيدز والكتاليز(Oxidase and Catalase). تتمكن عزلات هذا النوع البكتيري من تخمير العديد من السكريات منتجة حامض اللاكتيك من دون الغاز وكذلك لها القابلية في إنتاج أنواع متعددة من منتجات الايض خارج خلوية التي منها السموم والأنزيمات والتي تعد ذات تأثير كبير في أمراضيه هذا النوع البكتيري (Baron *et al.*, 1994).

2- 1- 4 تشخيص *Streptococcus pyogenes*

لوحظ في السنوات الأخيرة تزايد حالات الإصابة بالحمى الروماتيزية(Rheumatic Fever/RF) ومرض روماتيزم القلب (Rheumatic Heart Disease)(RH) في مناطق عديدة من العالم بعد تكرار الإصابة بالتهاب البلعوم واللوزتين الناتج عن هذه البكتريا، إذ وجد انه في الهند ان هناك 2- 3 مليون طفل يعاني كل سنة من الإصابة بالحمى الروماتزمية (Gupta *et al.*, 1992). ومن ذلك فقد اعتبر الإنسان المضيف الطبيعي الوحيد المعروف لبكتريا *S. pyogenes* (Bessen *et al.*, 1992) وبالتالي فان عزلها يتم من مناطق متعددة من جسم الإنسان اعتماداً على نوع الإصابة (Moses *et al.*, 1995).

يعتمد تشخيص النوع *S. Pyogenes* تقليديا على نوع مستعمراتها المزروعة من مسحة البلعوم أو اللوزتين على وسط اكار الدم، حيث يتم تشخيص المستعمرات المحاطة بمنطقة تحلل من نوع بيتا بطرائق التشخيص المعتمدة مثل فحص الحساسية لمضاد الباستراسين (Bacitracin)، والفحص المصلي (Mahno and Manuslis, 1995). والطرائق المصلية السريعة للتشخيص التي تعتمد على الترسيب (Precipitation) والتلازن (Agglutination) (Paul, 1999) وكذلك Faclam Latex (Roddey *et al.*, 1986)، إضافة إلى أمكانية استخدام جهاز ELISA (Hookey *et al.*, 1996) الذي يعتمد في الكشف عن الأجسام المتكونة لمستضدات

S. pyogenes التي منها ستربتولايسين O ، ستربتوكيناز والمستضد الكاربوهيدراتي للجدار.

2- 1- 5 ضراوة بكتريا *Streptococcus pyogenes*

2- 1- 5- 1 عوامل الضراوة الخارج خلوية:

ان للنوع *S. pyogenes* المقدرة على إنتاج أكثر من 20 منتجاً مستضدياً خارج خلوي والتي تعد من العوامل الامراضية المهمة لهذه البكتريا حيث تسهل انتشارها في أنسجة الجسم من خلال مقاومة دفاعاته (Baron and Jenning, 1991) وان من أهمها هي: -

2- 1- 5- 1- 1 أنزيم الستربتوكيناز (Streptokinase)

عبارة عن بروتين مستضدي، يفرز من جميع عزلات *S. pyogenes* ويقوم بتحليل الخثرة من خلال تحويل مولد البلازمين (Plasminogen) إلى بلازمين (Plasmin) فيؤدي إلى حل الفبرين (Fibrin) من خلال وجود الأنزيم المحلل للبروتين مسبباً إلى تحلل خثرة الدم (Atlas, 1995 and Talaro and Talaro, 1996).

2- 1- 5- 1- 2 أنزيم ديوكسي رايبونيوكليز
(Deoxy ribonuclease / DNAase)

يتم إنتاج هذا الأنزيم من عزلات بكتريا *S. pyogenes* حيث يعمل على التحليل المائي لل DNA وبالتالي يعطل عمل الأحماض النووية Coenzyme NAD^+ ويكون فعالاً عند ارتباطه بجدار الخلية البلعمية. يوجد أربعة أنواع من هذا الأنزيم مختلفة مستضديا هي A, B, C, D (Ross, 1995).

2-1-5-1-3 البروتييز (Proteinase)

ينتج هذا الأنزيم عادة من عزلات مجموعة المكورات المسبحية منها A وهو مسؤول عن تحلل البروتينات (Myrivic and Weiser, 1988).

2-1-5-1-4 أنزيم الهيالرونيديز (Hyaluronidase)

لهذا الأنزيم القابلية على تحليل حامض الهيالورونيك الموجود في الأنسجة لاسيما الرابطة منها لذلك تسمى بعامل الانتشار (Spreading Factor)، كونه يساعد على انتشار الجراثيم الممرضة في أنسجة الجسم، وهو مستضدي، وتبقى عياريه الأجسام المضادة لهذا الأنزيم مرتفعة عند الأشخاص في مرحلة النقاهة (Davis *et al.*, 1980).

2-1-5-1-5 السموم (SPES)

Streptococcus Pyrogenic Exotoxins

ان السموم التي تنتجها بكتريا *S. pyogenes* تشمل ثلاثة أنواع مستضدية مختلفة هي A وB و C (Kamezawa *et al.*, 1997). والتي تكون مرتبطة مع متلازمة الصدمة السمية (Toxic like Shock Syndrome) والحمى القرمزية (Jawetz *et al.*, 1984).

2-1-5-1-6 الهيمولايسين Hemolysins:

تفرز عزلات المسبحيات المجموعة A والعديد من عزلات المجموعتين C و G نوعين من الهيمولايسين هما ستريتولايسين O (Streptolysino) SLO و ستريتولايسين S (Strepolysin) SLS اللذان يختلفان احدهما عن الأخر مستضديا، ويشتركان في قابليتهما على حل كريات الدم الحمراء الذي ينتج عنه ظهور منطقة شفافة من التحلل حول المستعمرة على طبق اكار الدم (Tagg and Vugler, 1986).

2- 1- 5- 2 عوامل ضراوة البنية المستضدية (Antigenic Structure)

2- 1- 5- 2- 1 المستضد الكاربوهيدراتي الخاص بالمجموعة A:

(Group A Streptococcal. Carbohydrate / A-CHO)

يسمى أيضا متعدد سكريد مسبحيات المجموعة A (Group A Streptococcal Polysaccharide A-PS)، الذي يوجد في الجدار الخلوي للعديد من المسبحيات، ويشكل أساس التصنيف المصلي ضمن مجاميع لانسفيلد، استعملته الباحثة لانسفيلد لتصنيف المسبحيات إلى 18 مجموعة (Jewetz *et al.*, 1984)، وله اثر مهم في أمراضيه بكتريا *S. pyogenes*، وان نسبة المستضد الكاربوهيدراتي تبلغ ما يقارب 10٪ من الوزن الجاف لجدار الخلية البكترية (Davis *et al.*, 1990).

2- 1- 5- 2- 2 البروتين M (M-Protein):

هذا البروتين يعد من عوامل الضراوة المهمة التي تمتلكها بكتريا *S. pyogenes* وهو بروتين سطحي يظهر بشكل شعيرات من جدار الخلية البكترية (Deliving *et al.*, 1997)، يتركب من سلسلتين من الببتدات (Beachey *et al.*, 1980)، ومن خلال تغير النهاية الامينية لكل من السلاسل الببتيدية يوجد أكثر من 80 نمطاً مصلياً منه في بكتريا *S. pyogenes* (Mandell *et al.*, 1995). أما النهاية الكاربوكسيلية (C-Terminal) فتكون ثابتة جدا (Highly Conserved) ومرتبطة بثبات بالجدار الخلوي للخلية البكترية، حيث يرتبط حامض التكويك (Techoic acid) مع البروتين M ليكون ما يشبه Pili like.

2- 1- 5- 2- 3 المحفظة Capsulate:

تحتوي غالبية عزلات بكتريا *S. pyogenes* على المحفظة في تكوينها والتي تتركب أساساً من حامض الهيالورونيك (Hyaluronic acid) وان تكوينهما في الخلايا يكون في المراحل الأولى للنمو في الوسط وعند انتشار الخلايا في الدم والأنسجة فإنها تساهم مع بروتين M في مقاومة عملية البلعمة للخلايا المايكروبية من قبل خلايا الدم البيضاء (Schmidt *et al.*, 1996).

2- 1- 6 الأمراضية Pathogenicity :

تسبب بكتريا *S. pyogenes* العديد من الأمراض التي تصيب الإنسان ابتداء من الأمراض البسيطة مثل قرحة البلعوم (الحنجرة) (Sore throat) إلى المميتة مثل متلازمة الصدمة السمية

(Streptococcal toxic like Shock Syndrome/STSS) (Mandell *et al.*, 1995).

كما تسبب هذه البكتريا التهاب اللوزتين (Tonsillitis) والتهاب الأذن الوسطى (Otitis media) فضلا عن إصابتها للجلد وتسببها في تقرحه (Spesis) عند تلوث الجروح بها، وتزداد الإصابة حدة في حالة الجروح غير المعقمة وكذلك الحروق المؤدية إلى التهاب النسيج (Cellulitis) وقد تؤدي هذه البكتريا في بعض الحالات الى الموت عند حصول تسمم الدم (Septicemia) اذا ما دخلت البكتريا الرحم بعد الولادة. للبكتريا قدرة على إنتاج كميات كبيرة من السموم والأنزيمات التي تؤدي إلى زيادة ضراوتها، كما ان معظم هذه المنتجات هي عبارة عن مواد مستضدية تحفز على إنتاج الأجسام المضادة.

وإن من أهم الأمراض التي تسببها نوع بكتريا *S. pyogenes* هي:

2- 1- 6- 1 الحمى النفاسية (Perpural Fever)

ينتج عن دخول البكتريا إلى الرحم بعد الولادة اذ تسبب ارتفاعاً في درجة حرارة الجسم وبالتالي إلى ما يسمى بالحمى النفاسية (Perpural Fever)، التي تسبب تسمم الدم والموت (Peter, 1997).

2- 1- 6- 2 التهاب البلعوم واللوزتين (Pharyngitis and Tonsillitis)

يكون الجزء العلوي من القناة التنفسية من أكثر الأجزاء تعرضا للإصابة بالأمراض عند الأطفال الرضع وأطفال المدارس، وان للمرحلة العمرية تأثير مهم في معرفة العامل المسبب. إذ ان التهاب اللوزتين الفيروسي هو الأكثر شيوعا في الأطفال تحت سن ثلاث سنوات، اما التهاب اللوزتين الناتج عن بكتريا *S. pyogenes* فانه شائع في الأطفال عند عمر (3) سنوات او أكثر (Shanson, 1982) إن هذه البكتريا لها القدرة عند دخولها إلى أنسجة المضيف على الالتصاق بأسطح الخلايا الطلائية الموجودة في منطقة اللوزتين بوساطة الأهداب الموجودة على سطح الخلية البكترية وان التصاقها يكون من خلال وجود مركب (Lipotechoic acid) في جدار الخلية البكتيرية (Baron and Jening, 1991).

2 - 1- 6- 3 الإصابات الجلدية:

تسبب هذه البكتريا إصابات جلدية قيحية (Streptococcal Pyoderma)، حيث يتقيح الجلد ويتكون الخراج (Pus) وتشترك مع بكتريا *Staphylococcus aureus* في حدوث خمج موضعي للطبقات الخارجية من الجلد في الأطفال يعرف بالقوباء (Impetigo) الذي يعد من أكثر إصابات أنواع بكتريا *S. pyogenes* الجلدية انتشارا لاسيما عند عمر (3) سنوات او اكثر (Toddar, 1996).

فضلا عما ذكر فان لهذه البكتريا القابلية على أحداث الالتهابات العميقة مثل التهاب نسيج الجلد (Cellulitis) الناتج من إصابات الجروح والحروق والعمليات الجراحية، والتي يمكن ان ينتج عنها تجرثم الدم (Bacterimia) (Jawetz *et al.*, 1998).

2- 1- 6- 4 الحمى القرمزية (Scarlet Fever / SF)

يؤدي إفراز السم الخارجي المولد للطفح الجلدي (ET) إلى الإصابة بهذا المرض وتتشابه أعراض هذا المرض مع أعراض التهاب البلعوم واللوزتين قبل ظهور الطفح الجلدي ثم يظهر الطفح الجلدي المميز للحمى القرمزية بعد يوم او يومين من الإصابة بالمرض. ويصاحب هذا المرض تجرثم الدم وعجز في العديد من الأعضاء. وقد يؤدي إلى الموت في بعض من الحالات (Davis *et al.*, 1980 ; Peter, 1997).

2- 1- 6- 5 الحمى الروماتزمية (Rheumatic Fever / RF)

هي تفاعل التهابي غير تقيحي (Non Suppurative). ينتج بعد إصابة القسم العلوي للجهاز التنفسي (وليس بعد الإصابة الجلدية) ببكتريا *S. pyogenes* بفترة كامنة تتراوح بين 3 إلى 8 أسابيع. إن هذا النوع من الحمى يكون حصولها غير مرتبط مع حده الإصابة الأولية (Krugman *et al.*, 1985). وأنها تمثل مشكلة صحية خطيرة عند الأطفال لاسيما في الهند (Tnakur and Prakash, 1996) وذلك لحدتها وارتفاع نسبة الوفيات الناتجة عن ضرر العضلة القلبية (Myocardium) والصمامات القلبية (Kaplan, 1992). وتعد الحمى الروماتزمية من أكثر العقابيل (Sequelae) خطورة حيث تنتج من حالة إهمال الإصابة ببكتريا *S. pyogenes* لاسيما التهاب البلعوم (Chambers, 1994).

اما في حالة الإصابة الجلدية فأنها لا تؤدي إلى حدوثها. ونظرا لارتفاع نسبة الوفيات الناتجة عن ضرر العضلة القلبية (Myocardium) والصمامات القلبية (Cardiac Valves)، فانه يتوجب الوقاية من المضاعفات الخطيرة من خلال تمييز الأعراض المبكرة للأمراض الناتجة من بكتريا *S. pyogenes* مما يستدعي البحث عن طرائق سريعة. فعالة ومناسبة للتشخيص المبكر (Demellawy *et al.*, 1997).

ان هذه البكتريا تتمكن من إنتاج العديد من المستضدات من الأنواع الخارج والداخل خلوية التي تحفز على إنتاج الأجسام المضادة في أجسام المرضى المصابين. حيث أصبح بالإمكان الكشف عن العديد من الأجسام المضادة باستعمال الفحوصات المصلية (Olmez *et al.*, 1993). وقد وجد ان اغلب المصابين بالتهاب البلعوم المسبحي

يحصل لديهم ارتفاع في عيارية الأجسام المضادة للستربتولايسين O (ASO). لذلك فحص تحديد معيار الاضداد ضد Streptolysin O كونه ينتج من معظم عزلات بكتريا *S. pyogenes* في Antistreptolysin O (Khaled and Majeed, 1998).

2-2 بكتريا حامض اللاكتيك Lactic Acid Bacteria:

تتواجد إشكال مختلفة من الأحياء المجهرية في القناة الهضمية وتكون بأوزان قد تعادل اوزان بعض الأعضاء مثل الدماغ او الكلية (Hill, 2002) ويبلغ مجموعها الكلي في القناة الهضمية في جسم الإنسان ما يقارب 10^{16} خلية (Draser and Hill, 1974).

كما عرف حديثا ان الأطفال الحديثي الولادة يولدون وقناتهم الهضمية نقية ومعقمة اي انها خالية من أي جراثيم ولكن أثناء الولادة قد تنتقل الجراثيم من الفتحة التناسلية للام او من فضلات القناة الهضمية (Jaggi, 2005) وبهذا يكون الطفل عرضة للجراثيم الموجودة في البيئة المحيطة منذ الساعة الأولى من الولادة ولذلك يمكن عزل الأحياء المجهرية الطبيعية من براز الأطفال (Conte *et al.*, 2006).

يمكن ان تصل أعداد البكتريا من الجنسين Bifidobacteia, Lactobacill خلال الشهر الأول من عمر الطفل بين 10^{7} - 10^{10} خلية/غرام (Jaggi, 2005) وان وزنها الكلي في جسم الإنسان البالغ يمكن ان يصل إلى كيلو غرام واحد. ولقد وجد ان الكثير من الأغذية المفيدة صحياً تكون حاوية على نسبة عالية من هذين الجنسين (Draser and Barrow, 1985).

أشار العالم Nelson في سنة (1983) الى ان مستوى الحموضة تكون مرتفعة في وسط أمعاء الأطفال المعتمدين على الرضاعة الطبيعية في حين لوحظ ارتفاع القاعدية في وسط أمعاء الأطفال المعتمدين على الرضاعة الصناعية وذلك لوجود جراثيم Lactobacill و Bifidobacteria بأعداد كبيرة في امعاء الاطفال المعتمدين على الرضاعة الطبيعية بينما ترتفع أعداد النوع *E. coli* في أمعاء أطفال الرضاعة الصناعية. (Messaoudi *et al.*, 2005) ان السبب في ذلك يمكن ان يعود إلى وجود عوامل النمو في حليب الأم التي تحفز نمو الجراثيم الصديقة (Friendly bacteria) التي

تتمكن من إنتاج عوامل حماية متعددة وبكميات كافية لحماية الأطفال من الإصابة بحالات الإسهال المتسبب عن وجود العصيات القولونية (Servin, 2004).

ان الأحياء المجهرية في القناة الهضمية للإنسان يمكن ان تقسم إلى قسمين:

الأول: الأحياء المستوطنة (Resident) التي تكون معمره في القناة الهضمية والقادرة على البقاء دوما في مواضع معينة والالتصاق بها بأعداد وفيرة.

اما الثاني فهي الأحياء الانتقالية (Transient) التي تكون غير قادرة على البقاء والالتصاق بالأمعاء لمدة طويلة (Bozaglu and Ray, 1996) (Mahowald *et al.*, 2009).

وتمتاز جميع أجناس بكتريا حامض اللاكتيك في كونها عبارة عن سلاسل من عصيات او كريات موجبة لصبغة كرام, غير متحركة, غير مكونة للسبورات, تنتج حامض اللاكتيك Lactic acid كناتج لايض التخمر وتستخدم اللاكتوز Lactose كمصدر رئيس للكاربون وإنتاج الطاقة (Cotter and Hill, 2003).

2- 2- 1- النوع *Lactobacillus acidophilus*

يقع جنس *Lactobacillus* ضمن المجموعة التاسعة عشر في المفتاح التصنيفي Bergeys Manual تحت عنوان (Regular Nonsporing Gram Postive Rods) ويقع تحت هذا الجنس أنواع عديدة قد تصل إلى أكثر من 70 نوعاً مشخصة في الدراسات العالمية ومصنفة ومن ضمنها (19) نوعاً مشخصة موجودة في القناة الهضمية ومستخدمة كمعزز علاجي (Probiotic) (Naser *et al.*, 2007).

أول من تعرف على هذا النوع من البكتريا هو العالم الأمريكي Moaro سنة 1900 حيث تم تشخيصها وعزلها من براز الأطفال الرضع وعرفت باسم *Bacillus acidophilus* وبعد مرور سنة من نظرية ماجنكوف تغير الاسم وأطلق عليها *Lactobacillus acidophilus* (Axelsson, 1998).

أصل الاسم جاء من كلمة Lacto تعني حليب (Milk) وكلمة (bacillus) تعني عصيات "rods" وكلمة acidophilus تعني المحبة للحموضة "acido-loving" (Axelsson, 1998).

يعد النوع *L. acidophilus* من أشهر أنواع جنس العصيات اللبنية المستخدمة كـ (Probiotic) وينتمي إلى المجموعة غير متجانسة التخمر (Gillianb, 1985 ; Holt *et al.* 1994)، ضمن جنس Lactobacillus والتي تقع ضمن عائلة Lactobacillaceae التي تعود إلى رتبة Lactobacillales وتقع ضمن صنف Bacilli والتي تقع ضمن قسم Fivmutes التي تعود إلى مملكة Procaryotae (Boone, 2001).

يُعُد هذا النوع من بكتريا حامض اللاكتيك المحبة للحموضة موجبة لصبغة كرام غير متحركة، غير مكونة للابواغ، سالبة لاختبار الكتاليز، سالبة للبيروكسديز، وتكون لاهوائية اختيارية، متحملة لقليل من الهواء Aerotolerant، لا تنتج الأمونيا من الارجنين وهي سالبة لاختبار إنتاج النايتريت Nitrate وتحلل الجيلاتين وقادرة على إنتاج الاندول وكبريتيد الهيدروجين H_2S (Paco *et al.*, 2003 و Kalender and Weiss, 1986).

تعيش هذه البكتريا في مستوى من الرقم الهيدروجيني يعد حامضياً بين 5 .2-5 .6 وبدرجة حرارة عالية ولكن الدرجة الحرارية المثالية تتراوح بين 30- 40°م ولا تنمو عند درجة حرارة اقل من 15°م (Sharp *et al.*, 1973).

ان عصيات حامض اللاكتيك من النوع *Lb. acidophilus* تكون ذات نهايات مدورة تتراوح إبعادها بين 0.6- 0.9×1.5 $^{-6}$ مايكروميتر، توجد مفردة او ثنائية او في سلاسل قصيرة. ويكون شكل مستعمراتها عادة خشنة، محدبة، غير شفافة، وغير ملونة حيث يكون قطر المستعمرة يتراوح مابين 2- 5ملم، تكون أحياء ذاتية التغذية كيميائية عضوية (Chemo organic trophs) وتحتاج إلى أوساط غذائية غنية ومعقدة، أهمها وسط De Man Rogosa Sharp (MRS)، وتنمو بشكل جيد عند

توفر 5٪ CO_2 وتنمو بظروف الأوكسجين المختزل. تتراوح نسبة القواعد النتروجينية C+G في الـ DNA بين 32- 53٪ مول (Holt *et al.*, 1994).

يتكون جدار العصيات الخلوي من الببتيدوكلايكان(Peptidoglycan) وحامض التكويك (Teichoic acid) الموجود في جميع الأنواع والضروري في التصاق العصيات بالخلايا الطلائية والسكريات المتعددة المرتبطة بطبقة الببتيدوكلايكان بواسطة أواصر فوسفاتية ثنائية الاستر (Phosphodiester bonds) (Sneath *et al.*, 1994).

تتواجد عصيات حامض اللاكتيك المحبة للحموضة في جميع الأغشية المخاطية للبائن وكذلك تتواجد في المنتجات اللبنية ومنتجات اللحوم ومنتجات الأسماك, وفي جميع العصائر الطبيعية للفواكه وفي الخضروات المخللة (Chumchalova *et al.*, 2004).

لا تتحمل هذه الجراثيم الدرجات الحرارية العالية والرطوبة او التعرض لأشعة الشمس حيث تتسبب في قتلها ويتم عزل هذه البكتريا بصورة رئيسة من براز الأطفال ومن الفم والمهبل في الإنسان (Axelson *et al.*, 1998). كذلك لوحظ ان عصيات حامض اللاكتيك السائدة في المهبل وأمعاء الإنسان تعود للنوع *Lb. acidophilus* وهي الشائعة والمستخدمة بشكل كبير كمعزز علاجي (Borriello *et al.*, 2003).

ان لهذه العصيات المقدرة في ايض اللاكتوز وتحسين بناء وإنتاج الفيتامينات وكذلك خفض مستوى الكولسترول في مصل الدم وتثبيط نمو الخمائر المرضية *Candida albicans* وإنشاء توازن مثالي بين جراثيم النبيت الطبيعي في الأمعاء. وكذلك تحسين امتصاص الكالسيوم من الأغذية المتناولة واختزال مستويات أورام الأمعاء وكذلك تعويض أعداد الجراثيم النافعة بعد العلاج بالمضادات الحيوية (Corcoran *et al.*, 2005).

لقد وجد Ishibushi وYamazaki (2001) ان هذه العصيات غير مرضية وغير منتجة للسموم ولها تأثير صحي مفيد حيث تعد LBA جزءاً من الـNormal Flora التي تتواجد في منطقة المهبل حيث تقوم بإنتاج الحامض الذي يساعد في الحد من نمو الفطريات مثل *Candida albicans* وبذلك تمنع حدوث الإصابات الفطرية

ويحصل نفس التأثير في حالة الإصابات المعدية المعوية (Cotter and Hill, 2003) والإصابات الفموية (Lievin and Servin, 2006)

ذكر العالم Arici (2004) ان هذه العصيات صعبة الارضاء (Fastidious) وتحتاج إلى الأملاح – الخلات – السترات – المنغنيز – مادة Tween80 – المركبات العضوية واللاعضوية – الأحماض الأمينة والدهنية – الفيتامينات – الكاربوهيدرات والببتيدات والنيوكليوتيدات. ان تعاطي المضادات الحيوية فموياً يعمل على قتل الجراثيم المفيدة ومن ضمنها الـ LAB وينصح الأطباء بتناول أنواع LAB بعد العلاج بالمضادات الحيوية لتعويض النقص الحاصل في نسب تواجدها حيث تكون مجهزة على شكل مسحوق او مضافة مع الأغذية

.(Donahus, 1998 and Kaur *et al.*, 2002 ; Borriello *et al.*, 2003 ; Ljungf and Wadstrom, 2006)

2- 2- 2- النوع *Bifidobacterium bifidum*

عصيات موجبة لصبغة كرام, لاهوائية, تبين ان بعض أنواعها تتحمل الظروف الهوائية ولكن بوجود كميات قليلة من CO_2 (Meile *et al.*, 1997), كما أنها غير مكونة للسبورات, غير متحركة, سالبة لاختبار الكتاليز واليوريز تكون نسبة الكوانين والسايتوسين لمادتها الوراثية DNA 54- 67٪. تمتلك أشكالاً مختلفة ومتباينة بين عصيات منحنية قصيرة إلى عصيات Club-Shaped rods وعصيات على شكل حرف Y وقد تكون بشكل bifid Form حيث اشتق اسم النوع *B. bifidum* من شكلها الذي يشبه bifid shape (Boone, 2001).

خلايا هذا النوع تكون اما منفردة او متجمعة في عناقيد وأزواجاً ذات شكل V وذات أبعاد 8- 1.5 او 1.3- 0.5 مايكرون (Martin *et al.*, 2009). تنمو عند درجة حرارة تتراوح مابين (37- 41°م) ورقم هيدروجيني يتراوح بين (6.5- 6.7) وأنها لا تتمكن من النمو عند رقم هيدروجيني اقل من (4.5- 5) وان الوسط الانتقائي لها هو TPY (Typical Phytone Yeast) ولكنها تنمو بصورة جيدة على وسط MRS (Scardovi, 1986 Hadadji *et al.*, 2005). هذه العصيات تحتاج إلى متطلبات متعددة في نموها إذ أنها تحتاج الكاربوهيدرات والفيتامينات إضافة إلى

الأحماض الامينية من الأنواع Arginine, Leucine, Isoleucine, Cysteine and Glutamic acid (Park *et al.*, 2003).

ان هذا النوع من العصيات له القابلية على استخدام سكر الفركتوز كمصدر للكاربون. وقد أكد (Gomes *et al.*, 1998) ان إضافة عناصر النمو التي فيها الفركتوز إلى الحليب المهدرج وبالكميات الكافية تسبب في استمرار نمو وفعالية النوع *B. bifidium* كمعزز حيوي. لقد وجد (Sgorbati *et al.*, 1995) ان أهم أنواع جنس Bifidobacterium التي يمكن ان تتواجد في القناة الهضمية للإنسان هي الأنواع *B. Lactis, B. longum, B. breve, B. bifidum, B. adolescentis*، ويعود النوع *B. bifidium* إلى جنس Bifidobacterium ضمن العائلة Actirobacteriaceae والى رتبة Actirobacteriales وصنف Actirobacteria ضمن قسم Bacteria (Boone, 2001). عزلت هذه العصيات لأول مرة من قبل العالم Heny Tisser وذلك أثناء قيامه بفحص براز أطفال معتمدين على الرضاعة الطبيعية (Tisser, 1900).

اما في الوقت الحالي فقد تم عزل وتشخيص ما يقارب أكثر من 34 نوعاً مشخصاً وأطلق عليها *Bifidobacterium bifidum* اعتماداً على صفاتها المظهرية وقد وجد بأنها تتواجد في الغالب في بطانة الأمعاء الغليظة والقناة المهبلية وفي القناة المعوية إذ تبين بأنها تشكل جزء مهم من الفلورا الطبيعية فيها وقد عرف هذا النوع بأسماء متعددة منها *Lactobacillus parafidus, Bacterium bifidium, Lactobacillus bifidus, Bacillus bifidus*
(Baron *et al.*, 1989 و Liungh and Wadstrom, 2006).

ان نسبة هذه العصيات في القناة المعوية للإنسان تشكل الغالبية العظمى حيث يمكن ان تصل إلى 99٪ من محتواها من النبيت الطبيعي اما المتبقي فانه يمكن ان يعود إلى أنواع الجراثيم *Lactobacilli, Enterococci, Coliforms* (Scarovi, 1986 وBankovic and Baras, 2001). ان هذه النسبة في أعدادها تختلف حسب الفئة العمرية إذ أنها يمكن ان تصل في الأطفال الرضع إلى أكثر من

99٪ من مجموع الفلورا الطبيعية لاسيما المعتمدين على الرضاعة الطبيعية بينما تكون بحدود 75٪ في الأطفال المعتمدين على الرضاعة الصناعية (Harmsen *et al.*, 2000).

ان هذا النوع يمكن ان يصل إلى الأطفال ذوي الرضاعة الطبيعية في الأيام الأولى بعد الولادة بأعداد هائلة. ولكن تقل أعدادها مع تقدم العمر ما لم تتوفر في الطعام إذ يتأثر تواجدها في الطعام. المضادات الحيوية والإجهاد (Santacruz *et al.*, 2009).

ان عصيات هذا النوع المتواجدة طبيعياً في أمعاء الأطفال الرضع يمكن الاستفادة منها في علاج حالات الإسهال لديهم وذلك من خلال إعطائهم بشكل جرع كبيرة فمويا ومن هذه الحالة بدأ الاهتمام بهذه الجراثيم يتزايد لما لها من أهمية عالية في المحافظة على الحالة الصحية للأطفال (Tisser, 1906).

ان آلية عمل هذه الجراثيم لمنع الإصابة بالإسهال او الحالات المرضية الأخرى تعتمد على إنتاج العوامل المضادة للممرضات مثل البكتريوسينات و الأحماض العضوية و H_2O_2 بالإضافة إلى قيامها بغلق موقع ارتباط الممرضات والسموم مع الخلايا الطلائية فضلاً عن فاعليتها في تعديل الاستجابة المناعية للمضيف (Mack and Lebel, 2003).

ان أمكانية عصيات Bifidobacterium لإنتاج حامض الخليك أكثر من اللاكتيك وبنسبة 2:3 حيث يمتلك حامض الخليك فعالية مضادة للبكتريا السالبة لصبغة كرام أكثر مما في حامض اللاكتيك. (Cheikyossef *et al.*, 2008).

لقد أشارت الكثير من الدراسات إلى فعالية أنواع Bifidobacterium العالية تجاه تثبيط البكتريا السالبة لصبغة كرام. حيث تعمل هذه العصيات مع أنواع جنس Lactobacillus في السيطرة على توازن أنواع الفلورا الطبيعية للقناة الهضمية ومقاومتها للجراثيم المعوية المرضة (Weer kamp *et al.*, 1996). تعد عصيات Bifidobacterium شائعة جدا حيث توجد بشكل كبير في الأمعاء الغليظة اذ انها تزاحم المرضات والخمائر في الالتصاق ببطانة الأمعاء وتنافسها أيضا على الغذاء (Servin, 2004). كما ان قابليتها العالية في مقاومة أملاح الصفراء جعلتها تتمكن من البقاء بشكل ثابت في الأمعاء (Schell *et al.*, 2002).

فضلاً عما ذكر فان النوع *B. bifidum* له القابلية في استغلال اللاكتوز وتثبيط الجراثيم الضارة من خلال خفض الرقم الهيدروجيني للأمعاء بسبب إنتاج الأحماض الدهنية, حامض اللاكتيك وحامض الخليك. وقابليتها في امتصاص كميات كبيرة من ايونات الحديدوز Ferrous ions مثبطة بذلك نمو الجراثيم الضارة التي تستخدمها للتغذي وتساعد في تكسير مواد Nitrosamines (المادة الأساس المسببة للاوارم) وتثبط إنتاج هذه المواد في الأمعاء وكذلك تخمر الألياف غير القابلة للهضم والتي خلالها يتم إنتاج طاقة عالية كذلك يمتلك هذا النوع القدرة في بناء بعض الفيتامينات لاسيما فيتامين K و B ولها دور في تثبيط نمو هذه الاجناس و الأنواع المرضية مثل Sallmonella, Shigella, Listeria, *E. coli*, *Bacillus cereus* *C. albicans*, *S. aureus*, Clostrridium, *Campylobcter jejeuni*.

من خلال التنافس الذي يحصل معها على الغذاء والمغذيات وكذلك امتلاكها القابلية في المساعدة على امتصاص المعادن خصوصاً الحديد – المغنيسيوم – الزنك – الكالسيوم وان فائدة هذه العصيات جاءت من قدرتها في إنتاج حامض اللاكتيك والخليك ووجد أيضا أنها تساعد على خفض الكوليستيرول في مصل الدم وتحسين الاستجابة المناعية للمضيف (Mouni *et al*., 2009).

وجدت الدراسات الحديثة حول النبيت الطبيعي في الغذاء ان عصيات Bibifidium تدخل في إنتاج الأطعمة المخمرة وكذلك في إنتاج مستحضرات وقائية علاجية وبالتالي منع حالات اضطرابات القولون وفي منع الاضطرابات المعوية عند الأطفال وكذلك منع الإمساك (Constipation) ومنع تشمع الكبد (Cirrhosis liver) فضلاً عن منعها حدوث خلل في توازن الفلورا الطبيعية في الأمعاء الناتج من العلاج بالمضادات الحيوية, وأخيرا تحسين الحركة المعوية بشكلها الصحيح الدودي (Lievin *et al*., 2000). جاءت فائدة *B. bifidum* من الناحية العلاجية والغذائية من أهميتها في استخدامها كمعزز حيوي وهذا السبب أدى إلى تكثيف الدراسات حولها ولاسيما تأثيرها على صحة الإنسان (Servin, 2004).

ذكر Baron (1989) ان الكثير من الأطباء قد أكدوا على استخدام عصيات Bifidobacteria كمعزز حيوي حيث توجد بأشكال عدة اما حبوب او أقراص او كبسول او بشكل مستحضرات مجففة بالتصفيد Freeze-dried بأعداد 10^8 خلية حية/مل. وهنالك توعية صحية في استخدام المعززات الحيوي من الأنواع *S thermophilus, B. bifidum*. وذلك لتقليل الإصـــابة بالفايروسات مثل فايروس Rotavirus (Gomes *et al.*, 1998 ; Marteau *et al.*, 2001).

وقد حصلت خطوة حديثة متطورة في طريقة استخدام المعززات الحيوية من الأنواع Bifidobacteria و *lactoacidophilus* من خلال إضافتها إلى المنتج الغذائي ليصبح منتجاً علاجياً حيث وصلت أنواع هذه المنتجات إلى أكثر من 60 منتج تجاري تم إنتاجه بهذه الطريقة كما في صناعة اللبن والجبن والايس كريم (Shah, 2001).

2- 3 النباتات الطبية:

2- 3- 1 مقدمة:

استخدم الإنسان المصادر النباتية لإغراض طبية منذ عقود طويلة تعود إلى ما قبل التاريخ (Anesini and perez, 1993). حيث وجدت النباتات على الكرة الأرضية قبل وجود الإنسان عليها واستخدمها كمصادر مهمة للتغذية, واستعملها فيما بعد لمعالجة المرضى.

اتجهت أنظار الباحثين في الآونة الأخيرة تدريجيا إلى استخدام أساليب الطب الشعبي والتي تتمثل في الحصول على المواد العلاجية من مصادرها الأساسية مباشرة. لاسيما الأعشاب والنباتات البرية منها والمزروعة وكان هذا الاتجاه نتيجة عوامل متعددة منها خلو النباتات من المواد الكيميائية والصناعية التي يمكن ان تسبب الكثير من الأعراض الجانبية ذات التأثير السلبي وبشكل ملحوظ على صحة المريض. وقد سهل في ذلك التقدم العلمي والصناعي من طرائق وأساليب حفظ واستخلاص وتشخيص المركبات الفعالة في النباتات الطبية وكذلك سهولة استعمالها وتداولها ان ما يميز الأعشاب الطبية المعروفة في إمكانية استعمالها بدلاً عن الأدوية المصنعة كيميائيا هي في ان الإعراض الجانبية الناتجة عنها تكون قليلة جدا وذلك لأن المواد

الفعالة فيها تعتبر غير مركزة وسهلة الامتصاص من قبل خلايا الجسم فضلا عن قابلية الجسم في التعامل والتخلص من الفائض منها وكذلك في احتوائها على العديد من المواد الفعالة التي تتآزز مع بعضها لمعالجة المرض (الزبيدي، 1996).

ان نشوء المقاومة المايكروبية للعديد من المضادات الحيوية تشكل مشكلة طبية حقيقية ويعزى الجزء الأهم منها إلى الاستخدام السيء والمفرط للعوامل الضد المايكروبية (Beaulac, 1998). ومثال ذلك نشوء عزلات من النوع الجرثومي *Staphylococcus aureus* المقاومة للمثيسلين MRSA (Zhio *et al.*, 2002) ونتيجة لتطور مقاومة الأحياء المجهرية للمضادات الحيوية أصبح من الضروري إيجاد مواد بديلة يكون لها فعل قاتل او مثبط (Biava *et al.*, 1995). وتعد النباتات المصدر الذي لا ينضب لكثير من النواتج الطبيعية (Natural Products) والأدوية التقليدية التي قد تكون مصدر جديدا للعوامل الضد المايكروبية.

2- 3- 2 الكلغان Kulgan (Silybum marianum)

2- 3- 2- 1 الوصف العام للنبات *Silybum marianum (Milk thisthe)*

يُعُد نبات الكلغان من النباتات الحولية او ثنائي الحول طوله 1- 2 متر, لونه اخضر شاحب, وساقه بسيط او متفرع قليلاً، وهو مجوف (يحتوي الأخاديد)، وقطني قليلا، وغير مجنح أوراقه كبيرة مزركشة بعروق بيضاء وجيوبها مفصصة او أبرية إلى مثلثة وتحتوي على جيوب مسننه وفصوص مشوكة والأوراق القاعدية تتضيق إلى قاعدة جالسة وهي موجودة في الساق تتضخم مع محاور مهدبه شوكيه ومنتصبة بقوة. الأزهار بنفسجية او وردية او بيضاء والبذور سوداء نقطية شاحبة ذات حلقة صفراء بالقرب من القمة ومجعدة على نحو مستعرض (Schulz *et al.*, 1998).

ينتمي هذا النبات إلى العائلة المركبة Compositae (daisy) (الشماع، 1989). يتواجد في منطقة البحر المتوسط وفي أنحاء من أوروبا وأجزاء من أمريكا الشمالية واستراليا. ينمو في الترب الصخرية الجافة (الزبيدي، 1996). هذا النبات من النباتات الشعبية جدا في أوروبا لأهميتها الطبية والغذائية ومازالت مفضلة في فرنسا كخضار في السلطات. وان الأوراق والبذور تستخدم في طب الأعشاب. يرجع

استعمالها إلى أكثر من 2000 سنة (Vaknin et al, 2008) لهذا النبات القابلية على الانتشار عن طريق الرياح لان بذوره حاوية على تراكيب شعرية (الشماع، 1989).

2- 3- 2- 2 المواد الفعالة في النبات

الكلغان يحتوي على المركبات الفلافونية Flavonoids على شكل مركب يعرف بـ Silymarin هو المسؤول عن الفعالية العلاجية في النبات (1968, Wanger, *et al*.) (WHO, 2002) يتكون الـ Silymarin من ثلاثة أجزاء هي Silibinin, Silidianin, Silicrstin ويُعُّد المركب Silibinin الأكثر نشاطاً الذي ترجع إليه الفعاليات العلاجية بشكل كبير نسبة إلى Silymarin (Hikino *et al*., 1984 ،Schulz *et al*., 1998 ،Bisset, 1994).

2- 3- 2- 3 آليات عمل السليمارين (Silymarin)

2- 3- 2- 3- 1 الية منع التأكسد

يبدو ان للكلغان فعالية ضد تأكسدية في الكبد وكذلك الأمعاء الدقيقة والمعدة. وهذا المركب ممكن ان يقلل إنتاج الجذور الحرة وعملية بيروكسدة الدهون Lipid Peroxidation التي ينتج عنها تسمم الكبد. ان بيروكسدة الدهون هي النتيجة النهائية لضرر الجذور الحرة غير المستقرة لدهون الأغشية. إذ ان هذه الأغشية تحتوي على أحماض دهنية تتحول إلى بيروكسيدات وهايدروبيروكسيدات دهنية.

التركيب الفينولي للسليمارين يبدو انه يسمح لتكوين مركبات مستقرة من الجذور الهايدروكسيلية والاوكسيجينية (Azeredo *et al*., 1987). وان المركبات التي تمتلك القدرة في توفير الدفاعات الأساسية تجاه الأكسدة وإنتاج الجذور الحرة هي Superoxide dismutase, Catalase, Glutathonine (Campos *et al*., 1989 ; Halliwell & Gutteridge, 1990).

التركيب الفينولي للسليمارين قاد الباحثين إلى افتراض ان السليمارين يمكن ان تكون له فعالية مضادة للأكسدة. ففي دراسات على الجرذان المختبرية *invivo*

أوضحت ان السليمارين ممكن ان يقلل تركيز الجذور الحرة في الجرذان التي عرضت إلى Acetominophene في جرع سمية، صار عندها مستويات متزايدة من Glutathione المختزل والـ Super oxide dismutase عندما اعطيت سليمارين اصبحت مستوياتها موازية لمجموعة السيطرة (Muzes *et al.*, 1991).

وفي الإنسان أوضح الباحثون وجود زيادة في Glutathione Peroxidase في المصل وكذلك Super oxide dismutase في كريات الدم البيض والخلايا اللمفية. وكما أوضحت دراسه ان السليمارين ممكن ان يحمي الأغشية الدهنية للخلايا الكبدية (Wagner *et al.*, 1974).

2- 3- 2- 3- 2 آلية منع التسمم

أهم الاستعمالات لمادة السليمارين هي في وصفه علاجا ضد التسمم حيث يتم استخدامه كترياقاً (Antitode) ضد سموم الفطر وبالتحديد ضد سم الفطر *Amantia Phalloide*، من الدراسات الموثقة في أبراز الدور العلاجي لمادة السلبين Silibinin في الوقاية من حالات التسمم الناتجة من فطر Amantia هو ما حدث في مدينة Naples في ايطاليا، اذ تم إدخال اشخاص من عائلة واحدة كانوا قد تسمموا من جراء تناول فطر *Amantia phalloide* إلى مركز علاج التسمم في مستشفى Cordarell إذ لم تفلح أي من الأدوية والمواد العلاجية الروتينية المستخدمة في حالات التسمم من تحسين حالاتهم، ولكن بعد حقن المرضى عن طريق الوريد بمادة Silybin dihemisuccinate في اليوم الثالث وفي اليوم التاسع استبدلت بمادة Silybin Cyclodextrine ثم اخرج المرضى وهم بحالة صحية جيدة بعد ثلاثة أيام. ان هذه الدراسة أوضحت الدور المهم الذي يلعبه مركب السلبين في حماية النسيج الكبدي وخلاياه من التضرر بسم الفطر Amanite (Carducci *et al.*, 1996).

يمكن للكلغان ان يقلل المخاطر التي يتعرض لها المرضى المصابين بالسرطان وذلك عن طريق منع او معالجة الفشل الوظيفي للكبد لأولئك المرضى الذي يخضعون للمعالجة بالمضادات الحيوية التي تعمل ضد السرطان والتي قد تسبب الضرر للكبد على المدى القصير او الطويل من مدة العلاج (Ladas & Kelly, 2003).

2- 3- 3 الشاي الأخضر Green Tea

2- 3- 3- 1 وصف النبات Plant description

نبات دائم الخضرة معمر ساقه قائمة طويلة. أوراقه ذات لون اخضر داكن وتكون بيضوية متبادلة طولها (15- 4) سم. وحافتها مسننة. عرض الورقة مابين 2- 5 سم. الأزهار لونها ابيض على بتلاتها خطوط صفراء. تتفتح الأزهار وتعطي رائحة. وتظهر الأزهار بشكل عناقيد او منفردة. قطر الزهرة (2.5- 4) سم ولها 7 إلى 8 اوراق تويجية (Alschuler, 1998).

أصل النبات جنوب شرق أسيا خصوصا الصين حيث انهم استخدموه قبل 5000 سنة وزرع كذلك في اليابان والهند وسيرلانكا ويزرع أيضا في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية. حتى انه أصبح يزرع في أفريقيا وأمريكا الجنوبية (Hamilton-Miller, 1995).

2- 3- 3- 2 المركبات الفعالة للشاي

يحتوي الشاي على تراكيز مرتفعة من مركبات الفينولات المتعددة (Polyphenols) التي تمتاز بأنها تمتلك خصائص مضادة للأكسدة فضلا عن احتوائها على السكريات المتعددة (Polysaccharides) والفلافونيدات (Flavonoids) ومجموعة من الفيتامينات (C) و (B) و (E) و (A) (Grham, 1992). توجد الفينولات المتعددة بتراكيز عالية في الشاي الأخضر. والتي لها دور فعال في منع أمراض القلب والسرطان (Chemical Source International., 2000).

وان منها أنواع متعددة منها التانينيات(Tannins) التي هي عبارة عن مجموعة بسيطة من المركبات الفينولية المتعددة التي تستخلص من النباتات المتنوعة وأنها تمتاز في قابليتها على مقاومة الهضم والتخمر(Smith *et al.*, 2003) وكذلك الفلافونيدات(Flavonoids) التي تعد من المركبات الفينولية وهي الشائعة في الشاي الأخضر وأهمها هي Catechin التي منها gallaogatechin، epicatechin،

epigallocatechin gallate و epicatechin gallate ،epigallocatechin
.(Hollman *et al.*, 1999)

فضلاً عما ذكر فان الشاي الاخضر يحتوي على الحامض الاميني(Theanine) الذي يعد الوحيد الموجود فيه وتختلف كمياته مقارنة مع Catechin في الشاي حسب موعد جني الحاصل إذ ان أوراق الشاي المحصودة في الجزء الأول من موسم النمو قد تكون ذات محتوى عال من Theanine مقارنة مع أخر موسم النمو (Sadzuka *et al.*, 2000).

2- 3- 3- 3 فعالية التثبيط المايكروبي للشاي الاخضر

تبين من الدراسات الحديثة ان فعالية اغلب المستخلصات النباتية في تأثيرها كان على مواقع هدف غير التي توثر فيها المضادات الحيوية
.(Lee *et al.*, 1998 ; Hose gawa *et al.*, 1998)

ان مثل هذه النتائج أكسبت استخدام المستخلصات النباتية أهمية خاصة في معالجة المرضات الجرثومية لاسيما التي تكون مقاومة للمضادات الحيوية وقد وجد *Tode et al* (1989) في دراسته في الصين بان مستخلص الشاي الأخضر كان مثبطا او قاتلا لانواع البكتريا *Salmonella sp., S. aure*su. وكذلك بين (1990) *Ahne et al.* ان هذا المستخلص له تأثير ضد البكتريا *Erwinia sp* و *Clostridium* sp. وكذلك اشار (1989) Hara. الى ان مادة Catechin الموجودة في الشاي الأخضر كانت قاتلة لأنواع من البكتريا التي تسبب التسمم الغذائي التي منها *Vibrio* sp, *Staph. aureus, Clostridium* وان فعله يكون من خلال تمزيق الغشاء الخلوي للخلايا البكترية (Ikiag, 1993).

وتبين ان مركب Catechin المستخلص من الشاي الأخضر له القابلية في تحطيم أنواع البكتريا المسببة لتسوس الأسنان وانه لا يمنع تكوين Pluge فقط الذي تسببه بكتريا التسوس فقط بل يسبب في قتلها (Sakank, 1989). كذلك تبين ان الحامض Tannic acid المستخلص منه كان ذا اثر تثبيطي لنمو البكتريا المعوية (Chosa *et al.*, 1992). وان البكتريا الموجبة لصبغة كرام كانت أكثر حساسية

للتأثير القاتل (bacteriocidal) من الأنواع السالبة لصبغة كرام. وتبين أيضا ان الكافئين (Caffeine) المستخلص من الشاي كان له تأثير في تثبيط النوع الفطري *T. mentagrophyte* وخميرة *Candida albicans* وعدد من الأنواع البكتيرية (البناء, 1998).

واستطاع (2001) Sharquie *et al.* على أثبات فعالية المستخلص الخام لنبات الشاي في معالجة المصابين بخمج القوباء Impetigo وقد اثبت (Bakir, 2004) من خلال دراسة حول مقارنة لتأثير الشاي الأخضر والأسود على نوع بكتريا *Heliobacter pylori* في ان التأثير الأكبر كان من الشاي الأخضر.

2- 3- 4 الحبة السوداء *Nigella sativa*

2- 3- 4- 1 وصف النبات

الحبة السوداء نبات حولي عشبي شتوي، يتراوح طول النبات مابين 40- 60سم وفي بعض الأحيان يتجاوز طول النبات المتر الواحد. الأوراق مقسمة إلى أجزاء خيطية صغيرة طولها يتراوح مابين 2.5- 5سم تنمو بشكل أزواجاً متعاكسة مع بعضها البعض وان الأوراق السفلية تكون اقل طولا من الأوراق العلوية حيث يصل طولها إلى 10سم أحيانا (التميمي، 2001). لون الأزهار اما ابيض مشرب بالأخضر او ازرق شاحب ولها رائحة عطرية وتنمو في نهاية الأفرع (العاني، 1998). والثمار عبارة عن علب خضراء اللون (Capsule) تتحول إلى لون اسود عند نضجها وتتفتح وتنثر بذورها. (Evans, 2002) اما بالنسبة للبذور فتكون سوداء هرمية الشكل او بيضوية يتراوح طولها مابين 2.5- 3.5 ملم وسمكها اقل من 2 ملم ولها رائحة وطعم مميز (الزبيدي، 1996).

2- 3- 4- 2 المكونات الكيميائية

يبين التحليل الكيميائي للحبة السوداء المزروعة في غرب العراق احتواءها على 5.8٪ رطوبة بعد التجفيف المثالي لها و20- 42٪بروتين و38.1٪ زيت و20.18٪ كاربوهيدرات و11٪سابونين Saponin و4.5٪ رماد

AL-Kaisey *et al.*, 2002، العاني، 1998). كذلك تحتوي بذور الحبة السوداء على القلويدات والمعادن والفيتامينات (AL- Ani *et al*, 2002). يتكون بروتين بذرة الحبة السوداء من أحماض أمينيه أساسية (Essential amino acids) بنسبة 30٪ من الليوسين والفالين والهستدين والمثيونين وأحماض أمينيه غير اساسية Non-essential. amino acids بنسبة تتراوح مابين 69- 81٪ من الكلوتاميك والارجنين والاسبارتك والتايروسين (Chakravarty, 1976; Babayan *et al.*, 1978).

اما دهونها فتحتوي على زيت ثابت بنسبة 33٪ وزيت طيار بنسبة 1.5٪ ودهون أخرى. يتكون الزيت الثابت من 16.3٪ أحماض دهنية مشبعة Saturated fatty acids (البالميتك Palmetic والستريك Citric)، وبنسبة 83.7٪ أحماض دهنية غير مشبعة Unsaturated fatty acids من الأوليك واللينوليك (Al. -Jassir, 1992).

كما تحتوي الدهون على الثايموكينون ومشتقاته (EL-Alfy, 1975)، ومتعدد الثايموكينون Polythymoquinone (Abou -Basha, 1995 ; العاني، 1998). يكون السكروز نسبة 32.65٪ من الكاربوهيدرات الموجودة في بذرة الحبة السوداء، كما يكون الكلوكوز 32.44٪ اما الفركتوز فانه يصل إلى 21.72٪ (العاني، AL-Kaisey *et al.*, 20021998،).

فضلاً عما ذكر فإنها تحتوي على 11٪ من سابوينينات (العاني، 1998) التي من أهمها الهيدراجنين Hedragenin والدايوسجنين Diosegnin اللذان يستخدمان كلاهما في تصنيع الهرمونات الجنسية (Evans, 2002). كما تحتوي بذور الحبة السوداء على السابونين من الميلانثين Melanthin في تركيبها (Chacravarty, 1976).

وان محتواها من القلويدات يكون بأشكال النيجليلامين Nigellamine والنيحللسين Nigellicine اللذان لهما تأثير كبير في مستوى السكر بالدم (Abdulwahid, 2000 ; Attaur -Rheman 1985a, 1985ab). وكذلك ما يسمى بالنجلون Nigellone ورمزها الكيميائي $C_{12}H_{22}O_4$ (النجار، 1997) والثايمول Thymol (Abou-Basha et al., 1995 ; El- Alfy *et al.*, 1975 ; Ustun *et al.*, 1990).

كما تحتوي الحبة السوداء على ثلاثة أنواع من السترولات Sterols التي هي كاميسترول Campsterol، وستكماسترول Stigmasterol وبيتا ستيرول β-Sitostrol بواقع 118.7 و42.9 و26.3 ملغم/كغم على التوالي. وعدة أنواع من الدهون الفسفورية وأربعة أنواع من التوكوفيرول. (Zeitoun & Neff, 1995).

فضلاً عما ذكر فان بذورها تحتوي على عدد من العناصر منها الكالسيوم 4 .140، والمغنيسوم 65 .118، والبوتاسيوم 3 .789، الصوديوم 107.15، والفوسفور 449، والكبريت 361.8، والقليل من الحديد 1.65 (محسوبة بالملغرام/100غرام) (العاني، 1998).

كما تحتوي بذرة الحبة السوداء على حامض الاسكوربيك Ascorbic acid والكاروتين Carotin وفيتامين A والنياسين (الشماع، 1989) وأنزيم اللايبيز Lipase (Korchagina & Rudyk, 1979) (AL. Ani *et al.*, 2002).

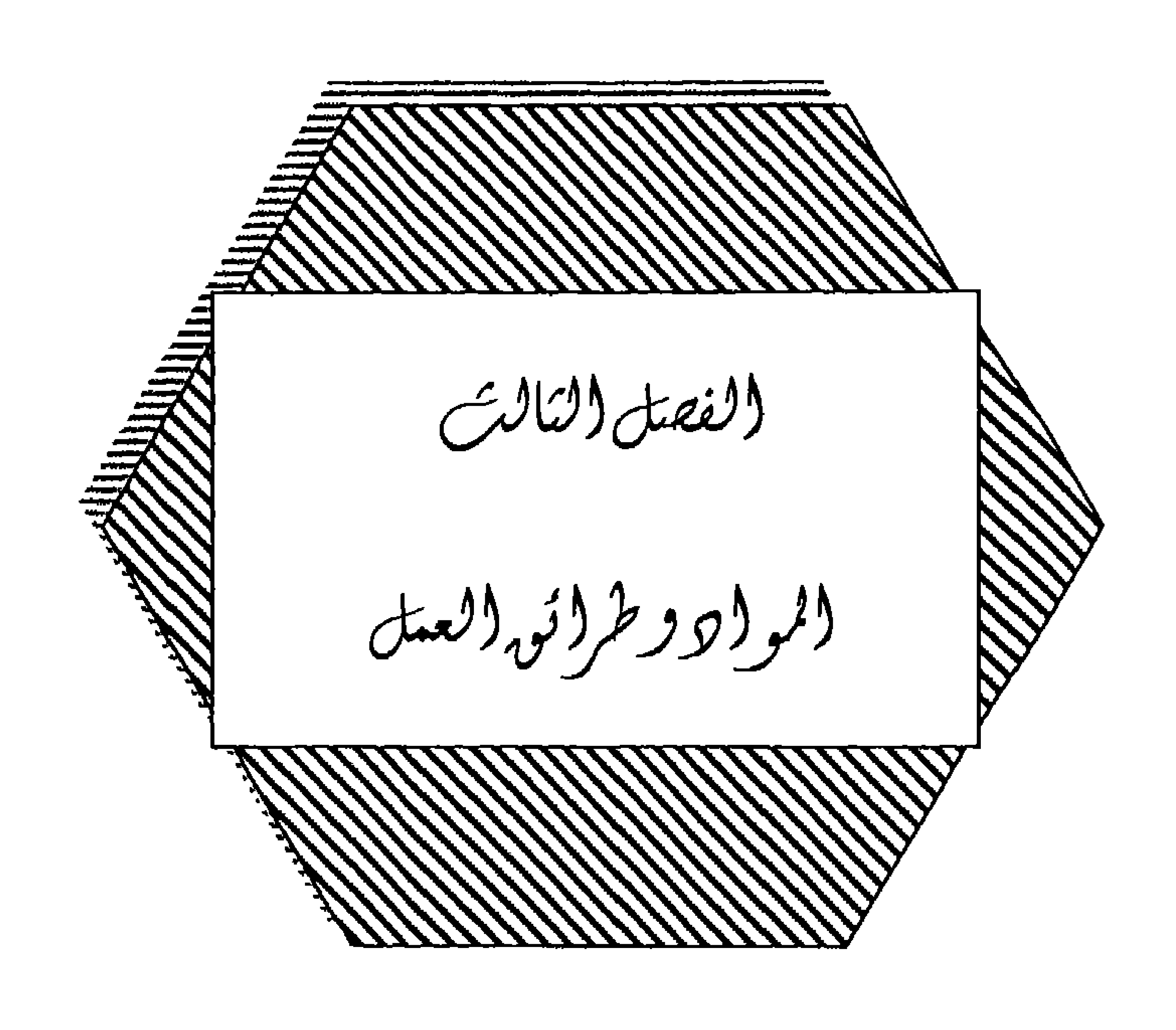
2- 3- 4- 3 الأهمية الطبية والغذائية للحبة السوداء

يعد نبات الحبة السوداء من أهم النباتات الطبية التي شاع استخدامها في الطب القديم والحديث، حيث ذكر فوائدها ابن سينا في كتابه القانون في الطب، وداود الأنطاكي في مذكراته وابن قيم الجوزيه في معجمه (1988)، وقد اتفق هؤلاء العلماء على ان الحبة السوداء او ما تعرف بحبة البركة لها فائدة في التخلص من الكثير من الامراض. في الطب المتقدم زاد الاهتمام بهذا النبات لما احتواه من مستخلصات ذات فائدة لجهاز المناعة وما قدمه في شفاء الكثير من الأمراض (التميمي، 2001). وبين Mahfouz and El-Dakhakhny (1966) و ChakraVarty (1993)، ان مركب النجلون (Nigellone) يعمل كمضاد للهستامين المتحفز في حالة نوبة الشعيبات القصبية لعلاج حساسية الصدر، ووجد ان زيت الحبة السوداء يوقف العديد من أنواع البكتريا وله اثر ايجابي في علاج التهابات الأذن الخارجية والتهاب الجيوب الأنفية (Toppo zada *et al.*, 1965 Hasan *et al.*, 1989).

توصل Bashandy (1996) ; AL-Haderet (1993) إلى ان الحبة السوداء دواء فعال في معالجة السكر وخفض الكلوكوز والكوليسترول وهو مضاد لعدد من

أنواع الخلايا السرطانية فضلا عن زيادة النشاط المناعي للجسم. وتم استخدام زيت الحبة السوداء كمادة حافظة طبيعية لزيادة القدرة التخزينية للزيد لقدرتها في تثبيط نمو الأحياء المجهرية المسببة للتلوث وفساد الأغذية وذلك كبديل للمواد الحافظة الصـناعية

.(Abouzeid and Mahmoud, 1993; El- Faham and Sawsan, 1994 and EL-Ghamry, 1998)


الفصل الثالث
المواد وطرائق العمل

3- المواد وطرائق العمل :

3- 1 الأجهزة والمواد المختبرية المستعملة

3- 1- 1 الأجهزة المختبرية Laboratory Instruments

يمكن تلخيص الاجهزة المختبرية المستخدمة في الدراسة كما في الجدول (3- 1) :

الجدول(3- 1) الاجهزة المختبرية المستعملة والشركات المصنعة وبلد المنشأ

ت	الجهاز APPARTUS	الشركة المصنعة COMPANY	المنشأ ORIGIN
1	Sensitive electronic balance ميزان حساس	Mettler	Switzerland
2	Electric oven فرن كهربائي	Memmert	Germany
3	Incubator حاضنة	Memmert	Germany
4	جهاز تقطير الماء Distiller Water System	Gallenkamp	England
5	Autoclave مؤصدة	Gallenkamp	England
6	Centrifuge جهاز نبذ مركزي	Kubota	Japan
7	Anaerobic Jar حاوية زرع لا هوائية	Gallenkamp	England
8	Vortex مازج كهربائي	Griffin	England
9	Light microscope مجهر ضوئي	Olympus	Japan
10	جهاز قياس الرقم الهيدروجيني PH- meter	Pyeunican	England
11	Shaking incubator حاضنة هزازة	Gallenkam	England
12	Electrical mill مطحنة كهربائية	Brabender	Swedian
13	Rotary Vacuum Evaporator جهاز تبخير	Heidolph	Germany

Korea	Labtach	Lyopholizer جهاز التجفيد	14
Germany	LKB	جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer	15
Turkey	Dikkat	مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV Light Source	16
England	Whattman	Vacuum Pump مضخة تفريغ	17

3- 1- 2 المعدات المختبرية Laboratory Equipment

يمكن تلخيص المعدات المختبرية المستخدمة في الدراسة كما في الجدول (3- 2):

الجدول (3- 2) المعدات المختبرية المستعملة والشركات المصنعة وبلد المنشأ

المنشا ORIGIN	الشركة المصنعة COMPANY	MATERIAL المادة	ت
Germany	Esplf	Test tubes أنابيب اختبار	1
USA	Humboldt	Bunsen burner مصباح بنزن	2
China	Wheel brand	Microscope Slide شرائح مجهريه	3
Germany	Memmert	Cover Slide أغطية الشرائح	4
India	Himedia	Loop ناقل جرثومي	5
Iraq	Localy	Microbial hood كابينة زرع مايكروبي	6
Jordan	Afma	Plain test tube أنابيب اختبار نبيذه	7
England	Pyrex	Conical Flask دوارق مخروطية	8
England	Pyrex	Glass Beaker بيكر زجاجي	9
Japan	Huawei	0.1ml ماصة دقيقة Micropipette	10
Germany	Himedia	Small Pore ثاقب فلين صغير	11
Japan	Hamilton	Micro Syringe حاقنة دقيقة	12
England	Pyrex	Glass Petri dishs أطباق زجاجية	13

Switzerland	Fluka	Filter Paper أوراق ترشيح	14
England	Pyrex	Ocular ruler مسطرة عينية	15
England	Huawei	Glass ناشر زجاجي معقم Spreader	16
England	Pyrex	جفنه خزفية	17
Germany	Memmert	Thermometer محرار	18

3- 1- 3 المواد الكيميائية والحيوية المستعملة

Chemical and biological Materials

يمكن تلخيص المواد الكيمياوية والحيوية المستخدمة في الدراسة كما في الجدول (3- 3) :

الجدول (3- 3) المواد الكيمياوية والحيوية المستعملة والشركات المصنعة وبلد المنشأ

المنشأ ORIGIN	الشركة المصنعة COMPANY	MATERIAL المادة	ت
England	BDH	acid حامض الهيدروكلوريك Hydrochloric	1
Switzerland	Fluka	Picric acid حامض البكريك	2
England	BDH	Sodium هيدروكسيد الصوديوم hydroxide	3
Germany	Merck	Sodium كربونات الصوديوم المائية Carbonate hydrate	4
USA	Difco	Copper كبريتات النحاس المائية sulfate hydrate	5
USA	Difco	Cupric كبريتات النحاسيك Sulfate	6
England	BDH	H_2O_2 بيروكسيد الهيدروجين	7
India	Himedia	Peptone Water ماء البيبتون	8
England	BDH	Neslar indicator كاشف نسلر	9
England	BDH	Sodium كلوريد الصوديوم	10

		Chloride	
England	BDH	Ferues oxide اوكسيد الحديد	11
Switzerland	Fluka	كاشف الفينونفثالين Phenolphtlaline indicator	12
England	BDH	Ethanol كحول اثيلي	13
England	BDH	Methanol كحول مثيلي	14
Switzerland	Fluka	Agarose اكاروز	15
England	BDH	Sodium ثنائي سلفات الصوديوم dithionite $Na_2S_2O_4$	16
England	BDH	Ammonium كبريتات الامونيوم sulfate	17
Germany	Merck	Bacitracin أقراص الباستراسين	18
USA	Oxoid	D-Fructose سكر الفركتوز	19
USA	Oxoid	Mannitol سكر المانتيول	20
USA	Oxoid	Sorbitol سكر السوربتول	21
Switzerland	Fluka	Xylose سكر الزايلور	22
USA	Oxoid	Cellobiose سكر السلبيايوز	23
USA	Oxoid	Melliobose سكر الميبايوز	24
USA	Oxoid	Saccharose سكر السكروز	25
USA	Oxoid	Trehalose سكر التريهالوز	26
USA	Oxoid	Raffinose سكر الرافينوز	27
USA	Oxoid	Glucose سكر الكلوكوز	28
USA	Oxoid	Lactose سكر اللاكتوز	29
USA	Oxoid	Maltose سكر المالتوز	30
USA	Oxoid	Mannose سكر المانوز	31
USA	Oxoid	Ribose سكر رايبوز	32
USA	Oxoid	Galactose سكر الكالاكتوز	33
England	BDH	Inuline كحول الانيولين	34
England	BDH	Salicin كحول الساليسين	35

England	BDH	KOH هيدروكسيد البوتاسيوم	36
England	BDH	Lead acetate خلات الرصاص	37
England	BDH	Ferous كلوريد الحديديك chloride	38
England	BDH	indicator كاشف بندكت Bendukid	39
England	BDH	Mayer reagent كاشف ماير	40
England	BDH	Wagner كاشف واكنر reagent	41
England	BDH	Dragendorff كاشف دراكندوف reagent	42
England	BDH	Vran reagent كاشف فران	43
Germany	Fluka	Crystal صبغة البلورات البنفسجية Violets	44
Germany	Fluka	Safranin صبغة السفرانين	45
Germany	Fluka	Coomassibule – R250 صبغة	46

3- 1- 4 الأوساط الزرعية Culture Media

تم تلخيص الأوساط المستخدمة في الدراسة كما في الجدول (3- 4) :

الجدول(3- 4) الاوساط الزرعية المستعملة والشركات المصنعة وبلد المنشأ.

المنشأ ORIGIN	الشركة المصنعة COMPANY	MATERIAL المادة	ت
India	Himedia	Muller Hinton Agar	1
India	Himedia	De Man Regosa Sharp Agar (MRS Agar)	2
India	Himedia	De Man Regosa Sharp broth (MRS broth)	3
India	Himedia	Brain Heart infusion Broth	4
India	Himedia	Nutrient Broth	5
USA	Oxoid	Sulfide Indol Motility	6

India	Himedia	Phenol Red Medium	7
India	Himedia	MRS-Agrinine Medium	8
England	Oxoid	Azide blood agar	9
England	Oxoid	Blood Agar	10
England	Oxoid	Crystal Violet blood Agar	11
USA	Difco	Kalback broth	12
England	Oxoid	Sugar Basal Medium	13

3- 1- 5 الكواشف Indicators :

3- 1- 5- 1 كاشف أنزيم الكتاليز :

استخدم محلول 3٪ بيروكسيد الهيدروجين (Cowan , 1985).

3- 1- 5- 2 كاشف بروموكريزول Bromocresol Purple :

تم إذابة 16غم من مسحوق الكاشف في 100مل من الايثانول 95٪ .

3- 1- 5- 3 كاشف نسلر (Nessler reagent)

استخدم لاختبار إنتاج الأمونيا من الارجنين وكما ورد في (Tang , 2006)

3- 1- 5- 4 كاشف الفينونفثالين Phenonphthaline Indicator ٪1

استخدم الكاشف للاستدلال عن الحموضة الكلية في الأوساط الغذائية البكتيرية المحضرة .

3- 1- 5- 5 ماء البيبتون Peptone Water

استخدم لأجراء التخافيف العشرية للمزارع البكتيرية وحضر بإذابة 21غم من البيبتون في لتر من ماء المقطر ثم وزع في أنابيب وعقم باستخدام المؤصدة بدرجة 121°م لمدة 15 دقيقة .

3- 1- 6 أقراص الباستراسين :

استعملت هذه الأقراص لغرض تشخيص بكتريا *S. pyogenes* وتفريقها عن انواع المجموعةβ.

3- 1- 7 النباتات الطبية المستخدمة Medical Plants:

الجدول (3- 5) النباتات المستعملة في الدراسة وأسماؤها الشائعة والعلمية

ت	النبات	اسمه الشائع	اسمه العلمي
1	الشاي الأخضر	Green Tea	*Camellia sinensis*
2	الكلغان	Kulgan	*Silybum marianum*
3	حبة السوداء	Black Cumin	*Nigella sativa*

3- 1- 8 الأوساط الزرعية

استخدمت الأوساط التي تم تحضيرها وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة وحسب تعليمات الشركة المصنعة وكان تعقيمها باستخدام المؤصدة عند درجة حرارة 121°م وضغط 1.5 جو لمدة 15 دقيقة ماعدا بعض الاستثناءات في تعقيم بعض الأوساط التي ستذكر في محلها (Atlas , 1995).

3- 1- 8- 1 وسط اكار الدم Blood Agar

أضيف 5٪ دم الإنسان إلى وسط **Blood Agar** استخدم هذا الوسط لتنمية البكتريا المسبحيه ومعرفة نوع التحلل الدموي لكل منها.

3- 1- 8- 2 وسط نقيع القلب والدماغ Brain heart infusion broth

استعمل هذا الوسط لتنمية أنواع البكتريا والحصول على المواد الايضية منها كذلك استعمل عند حفظها حيث يعُد وسطا مغذياً ويستخدم في تنشيط أنواع بكتريا LAB .

3- 1- 8- 3 وسط تخمر السكريات

حضر هذا الوسط كالأتي :-

1. حضر 900 مل من وسط نقيع القلب السائل و الدماغ.
2. حضرت محاليل المصادر الكاربوهيدراتية و Lactose , Manitol , Ribose , Raffinose , Salicin , Inulin) تم التحضير بإذابة 10غم من كل مصدر في 100مل ماء مقطر للحصول على تركيز 10٪ لكل منها . مزج 900 مل من وسط نقيع الدماغ والقلب مع محلول المادة الكاربوهيدراتيه للحصول على تركيز 1٪ .
3. أضيف 1مل من كاشف بروموكريزول الأرجواني (Bromocresol Purple) للتحري عن تكون ا لحامض .
4. استخدم هذا الوسط لدراسة قابلية أنواع البكتريا على تخمر المصادر الكاربوهيدراتية . (Starr *et al* , 1981) .

3- 1- 8- 4 وسط MRS السائل De Man Regosa Sharpe broth

تم تحضير الوسط بإضافة 55.15غم من وسط MRS السائل وإذابته في لتر من الماء المقطر استخدم هذا الوسط في عزل وتنمية بكتريا حامض اللاكتيك .

3- 1- 8- 5 وسط MRS الصلب De Man Regosa Sharpe Agar

تم تحضيره بإضافة 67.15 غم من الوسط الجاهز وإذابته في لتر من الماء المقطر ، واستخدم هذا الوسط في عزل وتنمية بكتريا Lactobacillus.

3- 1- 8- 6 وسط MRS-CaCO$_3$ Agar

استعمل هذا الوسط انتقائياً وتفريقياً لأنواع بكتريا حامض اللاكتيك من جنس Lactobacillus .

3- 1- 8- 7 وسط (SIM) Sulfide – Indol – Motility

استخدم هذا الوسط للكشف عن مقدرة بعض أنواع بكتريا حامض اللاكتيك على الحركة وكذلك القدرة على إنتاج كبرتيد الهيدروجين (H_2S) من قبلها .

3- 1- 8- 8 وسط آكار مولر هنتون Muller Hinton Agar (MHA)

تم التحضير بإضافة 38غم من الوسط وإذابته في الماء المقطر . استخدم هذا الوسط لاختبار الفعالية التثبيطية لبكتريا حامض اللاكتيك ضد نوع البكتريا *S. pyogenes* .

3- 1- 8- 9 محلول ثابت العكرة القياسي

MacFarland Standard Solution

تم تحضير محلول ماكفرلاند رقم 0.5 الذي يتكون من محلولين :-

أ- حضر بإذابة 1.75غم من كلوريد الباريوم في 100مللتر من الماء المقطر .

ب- حضر بإضافة 1مل من حامض الكبريتيك المركز إلى 100مل من الماء المقطر .

عند الاستخدام أضيف 0.5 مليلتر من محلول (أ) إلى 99.5 مليلتر من المحلول (ب) ، ثم وضع المحلول في أنبوبة زجاجية ذات غطاء محكم لمنع التبخر ، استخدم هذا المحلول للمقارنة لإعطاء عدد تقريبي للنمو الجرثومي مقداره (1.5×10^8) خليه/مليلتر . إذ أن عكارة هذا المحلول مطابقة للكثافة الخلوية لمعلق الجراثيم عند الأعداد المشار اليها (Barry , 1979) .

3- 2 طرائق العمل

3- 2- 1 عزل وتشخيص بكتريا *S. pyogenes*

3- 2- 1- 1 اخذ العينات

تم جمع مسحات من الجروح والتقرحات لاسيما الناتجة عن التهابات العمليات الجراحية وكذلك مسحات من مرضى مصابين بالتهاب اللوزتين (Tonsillitis). وكانت أعمار المصابين تتراوح مابين (4- 40) سنة من المراجعين لمستشفى تكريت التعليمي في محافظة صلاح الدين .

تم اخذ العينات باستعمال مسحه قطنية معقمة (Swab) من منطقة الجرح او منطقة اللوزتين بعد خفض اللسان بخافض اللسان(Tongue depressor) من قبل الطبيب المختص لتجنب ملامستها اللعاب وأخذت العينات إلى المختبر باستخدام الوسط الناقل البيبتون حيث تم زرع العينات بعد 2- 3 ساعات لأجراء العزل والتشخيص (Atlas, *et al.* , 1995).

3- 2- 1- 2 زرع العينات

زرعت العينات بتدوير المسحه فوق سطح اكار أزايد الدم او اكار الدم وصبغة البنفسج البلوري . وباستخدام الناقل الجرثومي استخدمت طريقة التخطيط للحصول على مستعمرات متميزة مفردة التي تم تحضينها بظروف لا هوائية باستخدام حاوية الزرع اللاهوائية وطاقم Anerobic Jar Gas Pak عند 37°م لمدة 24 ساعة .

3- 2- 1- 3 عزل بكتريا *S. pyogenes*

فحصت الأطباق لملاحظة وجود مستعمرات بكتريا *S. pyogenes* في العزل الأولي ولوحظت منطقة تحلل الدم حول هذه المستعمرات . بعد ذلك تم نقل مستعمرة واحدة إلى وسط آكار الدم لغرض تنقية العزلات ، ثم حضنت الأطباق هوائيا لمدة (24- 48) ساعة وذلك لملاحظة التحلل الذي يحصل بسبب انتاجها للسم Streptolysin O .

3- 2- 1- 4 تشخيص بكتريا *S. pyogenes*

تم التشخيص حسب ما ورد في (Colle *et al* , 1996) وذلك اعتماد على الصفات التالية:

3- 2- 1- 4- 1- الصفات الزرعية :

تم التشخيص الأولي من خلال ملاحظة المستعمرات النامية على وسط اكار الدم . وملاحظة صفاتها من خلال شكل المستعمرة ، حجمها ،شكل الحافة التي تمتلكها ، قدرتها على تحلل كريات الدم الحمر ، وشكل منطقة التحلل حول المستعمرة .

3- 2- 1- 4- 2- النمو عند درجات حرارة مابين 20 الى 50°م

لقح وسط آكار الدم بالعزلات البكتيرية باستعمال الناقل المعقم وحضنت بعد ذلك بدرجات حرارية 20 ، 25 ، 30 ، 35 ، 40 ، 45 ، 50 °م لمدة (42- 48) ساعة.

3- 2- 1- 4- 3- الفحوصات الكيميوحياتية (Biochemical tests)

3- 2- 1- 4- 3- 1- تخمر المصادر الكاربوهيدراتية

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط تخمر السكريات المعقمة بالعزلات البكتيرية وبعد ذلك تم تحضينها بدرجة حرارية 37°م لمدة 18 ساعة . وعند تغير لون الكاشف من الأرجواني إلى الأصفر كان دليلاً على ان التفاعل موجب.

3- 2- 1- 4- 3- 2- فحص الباستراسين Bacitracin test

لقحت الأطباق الحاوية على آكار الدم بالعزلات البكتيرية بطريقة التخطيط باستخدام ناقل معقم . وضعت بعد ذلك أقراص الباستراسين (0.04u) على سطح المزروع باستخدام ملقط معقم . بعد ذلك تم التحضين بدرجة حرارة 35°م لمدة 24ساعة وفي حالة ظهور منطقة تثبيط واضحة حول هذا القرص من المضاد الحيوي

فكان دليلاً على ان النتيجة موجبة . ويستعمل هذا الفحص للتفريق بين مسبحيات المجموعة A عن المجاميع الأخرى الحالة للدم نوع بيتا β .

3- 2- 1- 4- 3- 3- إنتاج الكتاليز Catalase Production

خطط وسط آكار نقيع الدماغ والقلب بالعزلات البكترية وحضنت عند درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة ثم بعد ذلك تم إضافة بضع قطرات من محلول 3٪ بيروكسيد الهيدروجين للمزروع ،وفي حالة تكون فقاعات غازية على سطح الآكار كان دليلاً على أن هذا التفاعل ايجابي .

3- 2- 1- 5- حفظ وإدامة العزلات البكتيرية

حضر وسط ادامة العزلات البكتيرية حسب تعليمات الشركة المصنعة والتي تضمن إضافة 20مل من الكلسيرول إلى 80 مل من نقيع الدماغ والقلب السائل ، وتم صبها في قناني صغيرة ذات غطاء محكم ثم عقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°م ولمدة 25 دقيقة ثم ترك الوسط ليبرد بدرجة حرارة الغرفة ، ولقح بعدها الوسط بمستعمرات نقية من البكتريا المنماة مسبقا على وسط Blood Agar باستخدام ناقل مختبري معقم وتم حفظها بعد اكتمال نموها عند حرارة (- 20) لحين استعمالها .

3- 2- 1- 6 انتاج واستخلاص وتقدير الستريتولايسينO

حضن المزروع البكتيري لكل عزلة بدرجة حرارة 35°م لمدة 12ساعة وكما في (Johnson *et al* ,1996) الذي أخذ منه 5 مل Streptolysin O ونبذ مركزيا بسرعة 1500دورة لمدة 30 دقيقة ثم قدرت كمية الستريتولايسين في المستخلص باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي 575 نانوميتر وكما ذكر في (Tuber,1995).

3- 2- 1- 7 تاثير بعض العوامل في النمو وانتاج الستربتولايسينO من قبل عزلات بكتريا *S. pyogenes*

3- 2- 1- 7- 1- تاثير درجة الحرارة :

لقحت الانابيب الحاوية على وسط Brain Heart infusion Broth السائل بمزارع بكتريا *S. pyogenes* بعمر 18- 24 ساعة وباعداد 1.5×10^{8} خلية/ مل وبنسبة لقاح 1٪ ثم حضنت عند درجة حرارة 20، 25، 30، 35، 40، 45°م لمدة 24 ساعة بعدها لوحظ معدل النمو من خلال وجود العكارة وقدرت كمية الستربتولايسينO فيها وكما ورد في (Tuber ,1995).

3- 2- 1- 7- 2- تاثير الرقم الهيدروجيني :

لقحت الانابيب الحاوية على وسط Brain Heart infusion Broth السائل بمزارع بكتريا *S. pyogenes* بعمر 18- 24 ساعة وباعداد 1.5×10^{8} خلية/ مل وبنسبة لقاح 1٪ ثم حضنت عند الرقم الهيدروجيني 4.5، 5، 5.5، 6.0، 6.5، 7.0، 7.5 و8.0 وحرارة 35 °م لمدة 24ساعة بعدها لوحظ معدل النمو من خلال وجود العكارة وقدرت كمية الستربتولايسينO فيها وكما في (Tuber ,1995).

3- 2- 1- 7- 3- تاثير تركيز Fe_2O_3 :

لقحت الانابيب الحاوية على وسط Brain Heart infusion Broth السائل بمزارع بكتريا *S. pyogenes* بعمر 18- 24 ساعة وباعداد 1.5×10^{8} خلية /مل وبنسبة لقاح 1٪ ثم حضنت عند تراكيز Fe_2O_3 1.25، 2.50، 5.0، 10.0ملغم/مل وحرارة 35 °م لمدة 24 ساعة بعدها لوحظ معدل النمو من خلال وجود العكارة وقدر منها كمية الستربتولايسينO فيها وكما في (Tuber ,1995).

3- 2- 2 عزل وتشخيص بكتريا حامض اللاكتيك :

3- 2- 2- 1 جمع النماذج :

جمعت النماذج من الألبان المتخمرة في الأسواق المحلية لمحافظة صلاح الدين التي كانت خمس عينات منها تحمل علامة الصافي وثلاثة من علامة البان الجامعة وست عينات مصنعة حرفياً في البيوت اثنان من كل من مناطق العلم والبوعجيل وبيجي وضعت في فلإسكات معقمة حجم 250 مل وتم حفظها في الثلاجة لحين استخدامها في عزل بكتريا حامض اللاكتيك .

3- 2- 2- 2 عزل البكتريا :

تم عزل أنواع بكتريا حامض اللاكتيك من المنتجات اللبنية بأخذ 10غم من كل عينة من عينات الألبان المختلفة وتم نقلها بعد ذلك إلى فلأسك حجمي سعة 100مل يحتوي 90 مل من وسط $MRS\text{-}CaCO_3$ السائل لكل عينة . حضنت العينات عند 30°م لمدة 72ساعة . أكمل عزل البكتريا بأخذ 1مل من الوسط السائل لكل عينة ونشر على الوسط الخاص لعزل بكتريا حامض اللاكتيك وهو $MRS\text{-}CaCO_3$ الصلب . بعد ذلك حضنت على درجة 35°م لمدة 48 ساعة لاهوائياً على وسط MRS لعزل انواع الجنسين Bifidobacterium وLactobacillus التي تم منها الحصول على عزلات بكتيرية مفردة, ثم نميت العزلات في وسط MRS السائل على 35°م وأجريت الفحوصات البايوكيميائية لكل عزلة للاستدلال على انواعها وبعد التأكد من الأنواع حفظت من خلال تنميتها على وسط MRS الصلب المضاف إليه كليسرول بنسبة 20٪ عند درجة - 20°م لحفظها لأطول فترة ممكنة وتم عمل مزرعة لتنمية الأنواع البكتيرية على وسط MRS الصلب وحفظها على درجة 4°م وأعيد التنشيط لها كل أربعة أسابيع (Holt , 2005) .

3- 2- 2- 3 تشخيص العزلات البكتيرية :

3- 2- 2- 3- 1 الفحص المظهري Morphology Test

يشمل تصبيغ العزلات بعد أعدادها بصبغة كرام وكذلك اختبار امتلاك السبورات من قبل كل من العزلات البكترية .

3- 2- 2- 3- 2 فحص الحركة وانتاج كبريتيد الهيدروجين

استخدم لهذا الفحص وسط Sulfide – Indo – Motility حيث تم تلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط بمستعمرة فتية بطريقة الطعن إلى عمق الوسط وبعد التحضين عند حرارة 37°م لمدة 18- 24ساعة سجلت النتائج . حيث كان تكون الراسب الأسود ذا دلالة ايجابية على انتاج غاز كبرتيد الهيدروجين وان عدم تكونه كانت دلالة على سالبيه الاختبار . اما اختبار الحركة فكان من خلال ملاحظة انتشار النمو الجرثومي إلى ابعد من خط الطعن او التلقيح (Harrigan and Mccance, 1976)

3- 2- 2- 3- 3 الاختبارات المزرعية :

أ- التحضين في وسط يحتوي على نسب مختلفة من كلوريد الصوديوم :- حضرت أنابيب حاوية على وسط MRS السائل المضاف إليه 4.5 و 6.5٪ من كلوريد الصوديوم (NaCl) التي تم تلقيحها بالمزارع السائلة من بكتريا حامض اللاكتيك بنسبة ألقاح 1٪ وبعمر 18- 24ساعة . وحضنت الأنابيب عند درجة حرارة 37°م لمدة 24- 48 ساعة بعد ذلك لوحظ تكون او عدم تكون العكارة للاستدلال على النمو الجرثومي (Tuber , 1995) .

ب- التحضين بدرجات حرارية مختلفة :- حضرت الأنابيب الحاوية على وسط MRS السائل بتلقيحها بالعزلات من أنواع بكتريا حامض اللاكتيك بعمر 18- 24 ساعة وبنسبة لقاح 1٪ ثم حضنت عند درجات حرارة 15 و 37 و 45 و 60°م لفترة 24 ساعة تم الاستدلال على قابليتها في النمو من خلال وجود العكارة .

3- 2- 2- 3- 4- الاختبارات البايوكيميائية :

أ- اختبار انتاج الأمونيا من الارجنين :

لقحت الأنابيب الحاوية على الارجنين- MRS (MRS- Arginine) بنسبة لقاح (1٪) من مزارع بكتريا حامض اللاكتيك النامية في الأوساط السائلة بعمر 18- 24ساعة حسب طريقة (1976) Harrigan and Maccance , ثم حضنت الأنابيب عند درجة حرارة 37°م لمدة 72ساعة . اخذ 1 مل من المحلول وأضيف له 1 مل من كاشف نسلر . ولوحظ لون الوسط الزرعي إذ ان عدم تغير اللون البرتقالي كان دليلاً على عدم قدرة الأنواع البكتيرية المختبره على انتاج الأمونيا , مع مراعاة قراءة النتيجة مباشرة بعد إضافة الكاشف (Briggs , 1953) .

ب- اختبار تخمر الكاربوهيدرات:

تم زرع العزلات وتنميتها بعد ان تم استبدال المصدر الكاربوني من وسط تخمر السكريات بإحدى السكريات الاتية : Sorbitol وManitol و D-Fructose وGalactose و Raffinose و Trehalose و Ribose وLactose و Maltose و L- Arabinose و Cellobiose وXylose و Saccharose وبنسبة 1٪ وكانت الإضافة للسكريات بعد تعقيم الوسط الأساسي بالمؤصدة إذ تم تعقيم السكريات باستخدام أوراق الترشيح Millipor حجم 0.22 ملم ثم حضنت العزلات المزروعة لمدة 24- 48 ساعة . وفي حالة التنمية اللاهوائية فقد تم إضافة قطرتين من البارافين المعقم الى كل أنبوب بعد التلقيح بالعزلة البكتيرية . وكان الاستدلال على ايجابية التخمر من خلال تغير اللون إلى الأصفر ، بعد الحصول على العزلات تم تعليمها للتعرف عليها أثناء استخدامها في الاختبارات اللاحقة .

ج- اختبار الكتاليز :

أجرى هذا الاختبار للتحري عن مقدرة العزلات من أنواع بكتريا *S. pyogenes* و Lactic acid bacteria في انتاج أنزيم الكاتاليز وقد اتبعت طريقة (Atlas , 1995) وذلك بنقل كمية غير محددة من كل عزلة باستخدام عود خشبي

من عزلات البكتريا المنماة على وسط MRS الصلب او اكار الدم على شريحة زجاجية نظيفة وإضافة قطرة من بيروكسيد الهيدروجين 3٪ إليها . ثم ملاحظة النتيجة. ان انتاج الفقاعات الغازية كان دليلاً على ايجابية الفحص (Baron and Finegold, 1994).

د- اختبار انتاج غاز CO_2 :

تم تنمية العزلات البكتيرية على وسط Sugar Basal Medium (SBM) الذي كان فيه سكر الكلوكوز فيه بنسبة 2٪ في أنبوبة اختبار تحتوي على أنبوبة درهم بوضع مقلوب تم التحضين عند 35°م لفترة 3 أيام . ان ملاحظة تكون الغاز في الأنبوبة كان دليلاً على مقدرة العزلات المفحوصة على انتاج غاز ثنائي اوكسيد الكاربون .

3- 2- 3 انتاج النواتج الايضية من بكتريا حامض اللاكتيك:

تم تنمية نوعي بكتريا حامض اللاكتيك في دورق حجمي ذا سعه 250 مل باستخدام الوسط الزرعي السائل نقيع الدماغ والقلب Brain Heart infusion Broth وبعد التحضين بدرجة 30°م لمدة 24 ساعة رشح محتوى قسم من الفلاسكات باستخدام اوراق الترشيح Millipore حجم 0.45 ملم وبعد ان اخذ الراشح تم تركيزه للحصول على سائل كثيف تم حفظه على - 20°م اما الجزء الاخر منها فقد استخدم انياً كخلايا حية باعداد 1.5×10^{8} خلية/مل في الاختبارات اللازمة في الدراسة .

3- 2- 4 المستخلصات النباتية :

3- 2- 4- 1 تحضير النباتات:

نظفت النباتات من الأجسام الغريبة العالقة بها ثم جففت في صواني كبيرة في الظل من خلال تسليط تيار هوائي معتدل . طحنت أوراق الشاي وبذور الكلغان وبذور الحبة السوداء بمطحنة كهربائية ثم حفظ المسحوق في أوعية زجاجية محكمة الغلق بعد تعليمها عند درجة حرارة 4°م لحين الحاجة في استعمالها.

3- 2- 4- 2 : المستخلص المائي:

اتبعت طريقة (Anesini and Prerz , 1993) للحصول على المستخلص المائي وكالاتي: وزن 15غم من المسحوق النباتي في دورق زجاجي حجم 250مل وأضيف إليه 100مل من الماء المقطر عند درجة 25°م ثم وضع الدورق في الحاضنة الهزازة عند سرعة 50دورة/دقيقة على درجة 35°م لمدة 24 ساعة ، بعدها تم نبذ سوائل العينات باستخدام جهاز الطرد المركزي بواقع 3000دورة/دقيقة لمدة 15دقيقة ثم رشح الرائق باستخدام ورق الترشيح (Whatman N0.1) ركزت رواشح العينات باستخدام جهاز المبخر الدوار (Rotary evaporator) لحين الحصول على سائل كثيف . تم تبخير السائل المتبقي باستخدام جهاز التجفيد (Lyopholizer) السطحي للحصول على مسحوق جاف وكما في (Ladd *et al* .,1978).

3- 2- 4- 3- الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلصات :

3- 2- 4- 3- 1 الكشف عن الراتنجات Resins

اخذ 5غم من المسحوق النباتي الجاف وتم إضافته إلى 50مللتر من الكحول الاثيلي 95٪ وترك لمدة دقيقة واحدة في حمام مائي مغلي عند درجة 100°م وتم بعد ذلك ترشيح المحلول وأضيف إليه 100مل من ماء لـ 4٪ حامض الهيدروكلوريك . واستدل عن وجود المواد الراتنجية من خلال ظهور العكاره (AOAC, 2002) .

3- 2- 4- 3- 2 الكشف عن الكلايكوسيدات Glycosides

اخذ 5 مل من كاشف فهلنك وتم مزجه مع 5مل من المستخلص المائي لمسحوق العينات وترك المزيج في حمام مغلي عند درجة 100°م لمدة 10 دقائق وقد استدل عن وجود الكلايكوسيدات من تكون راسب احمر . وللتأكد من صحة الاختبار أضيف 1مل من المستخلص المائي إلى 5مل كاشف بندكت ، وبهذا استدل على وجود الكلايكوسيدات بظهور الراسب الأحمر (AOAC,2002) .

3- 2- 4- 3- 3 الكشف عن الفلافونات Flavonoids

تم الكشف عن الفلافونات حسب طريقة (Jaffer *et al* .,1983) التي تضمنت تحضير محلولين:-

المحلول الأول : يتكون من إذابة 10غم من المستخلص لكل من العينات في 5مل من الكحول الاثيلي 95٪ ثم رشح المحلول .

المحلول الثاني : حضر من إضافة الكحول الاثيلي 50٪ إلى محلول هيدروكسيد البوتاسيوم KOH 50٪ يتم مزج المحلولين مع بعضهما بكميات متساوية واستدل من خلال ظهور اللون الأصفر على وجود الفلافونات .

3- 2- 4- 3- 4 الكشف عن الفينولات Phenols

رطبت ورقة ترشيح بالمستخلص من كل من العينات ثم أضيفت قطرات من كاشف فران او كلوريد الحديديك وعرضت إلى بخار الأمونيا . ان ظهور اللون الأزرق كان دليلاً على وجود الفينولات . (AOAC,2002).

3- 2- 4- 3- 5 الكشف عن الصابونينات Saponins

تم عمل محلول مائي من مسحوق العينة الجافة ثم وضعت في أنبوبة اختبار ورجت جيدا . استدل من خلال ظهور رغوة كثيفة تبقى مدة طويلة على وجود الصابونينات . (AOAC,2002).

3- 2- 4- 3- 6 الكشف عن القلويدات Alkaloids

تم غلي 10غم من مسحوق النبات المضاف إلى 50مل من الماء المقطر المحمض ب 4٪ من حامض الهيدروكلوريك ورشح المحلول بعد ان برد (Stahl , 1969) . وبعد ذلك وضع 0.5مل من الراشح في زجاجة ساعة مع كل كاشف من الكواشف الآتية :

1- كاشف ماير Mayer reagent : ظهور راسب ابيض .

2- كاشف واكنر Wagner reagent : ظهور راسب بني .

3- كاشف دراكندورف Dragendorff : ظهور راسب برتقالي .

4- حامض البكريك Picric acid : ظهور راسب اصفر .

ان ظهور هذه النتائج مع كل كاشف كان دليلاً على وجود القلويدات .

3- 2- 4- 3- 7 الكشف عن الكومارين Coumarin

أذيب 0.5 ملغم من مستخلص النبات في 1مل من الكحول في أنبوبة اختبار . ثم غطيت الأنبوبة بورقة ترشيح مرطبة بمحلول NaOH المخفف ووضعت في حمام مائي على درجة الغليان لبضع دقائق . ثم عرضت ورقة الترشيح للأشعة فوق البنفسجية وكان الدليل على وجود الكومارين من خلال ظهور لون اصفر- مخضر في ورقة الترشيح (Geissman , 1962) .

3- 2- 4- 3- 8 الكشف عن التانينات (العفصيات) Tannins

تم غلي 10غم من مسحوق النبات مع 50مل من الماء المقطر . رشح المحلول ثم ترك الراشح ليبرد . بعدها قسم إلى جزئين .

الجزء الأول أضيف إليه 1٪ من محلول خلات الرصاص . ودل ظهور الراسب الأبيض الهلامي القوام على وجود التانينات .

اما الجزء الثاني فقد أضيف إليه 1٪ من محلول كلوريد الحديديك ودل ظهور لون اخضر مزرق على وجود التانينات .

3- 2- 4- 3- 9 كشف النهيدرين Ninhydrine test

اضيف (1مل) من المستخلص إلى محلول النهيدرين 1٪ وسخن المزيج في حمام مائي ويدل ظهور اللون الأزرق البنفسجي على وجود الأحماض الامينية (AOAC,2002) .

3- 2- 5 تقدير نسبة الرطوبة:

تم تقدير الرطوبة في النماذج المحتوية على السائل الكثيف من بكتريا حامض اللاكتك والمستخلصات النباتية كما ورد في (AOAC, 2002) باستخدام الفرن الحراري على 110°م للمدة الزمنية التي ثبت عندها وزن المواد الايضية او

المستخلصات النباتية وتم بعدها احتساب نسبة الرطوبة المئوية من خلال الفرق بين الوزن النهائي والاولي للمواد الايضية.

3- 2- 6 تراكيز النواتج الايضية لبكتريا حامض اللاكتيك والمستخلصات النباتية:

تم وزن الكمية اللازمة من المسحوق الجاف للمستخلصات او النواتج الايضية وإذابته في 5 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 200 ملغم/ مل . عقم باستخدام ورق الترشيح Millipore ذي قطر 0.22 ملم.

3- 2- 7 تحديد التداخل بين الخلايا او النواتج الايضية من بكتريا حامض الاكتيك او المستخلصات المائية للنباتات في الاعداد الكلية وانتاج الستربتولايسين O من عزلتي *S. pyogenes*:

استخدم وسط Brain Heart Infusion broth في تحديد فاعلية خلايا انواع بكتريا حامض اللاكتيك بعد تنمية كل نوع منها على حده او سوية مع كل من عزلتي بكتريا *S. pyogenes* باعداد 1.5×10^{8} خلية / مل عند درجة حرارة 35 ^{o}م و لمدة 24 ساعة و بعدها قدرت اعداد بكتريا *S. pyogenes* وذلك من خلال نقل 0.1 مل إلى وسط Blood Agar وتنميتها عند درجة حرارة 35 ^{o}م ولمدة 24 ساعة اما الستربتولايسين O فقد تم تقديره من راشح وسط Brain Heart Infusion broth كما في (Tuber , 1995).

اما النواتج الايضية من بكتريا حامض اللاكتيك عند تركيز 10 ، 20 ، 40 ملغم / 100مل او المستخلص المائي للنباتات عند تركيز 25 ، 50 ، 100 ملغم / 100مل فقد تم من خلال اضافة كل تركيز منها إلى 100 مل من وسط Brain Infusion broth في دورق حجم 250 مل والذي يحتوي على 1 مل من خلايا *S. pyogenes* باعداد 1.5×10^{8} خلية / مل والتنمية عند درجة حرارة 35 ^{o}م لمدة 24 ساعة بعدها قدرت اعدادها من خلال تنميتها على وسط Blood Agar لمدة 24

ساعة عند 35 °م وقدر الستريتولايسين O في راشح الوسط Brain Heart Infusion broth كما في (Tuber , 1995).

3- 2- 8 تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للنواتج الايضية من بكتريا حامض اللاكتيك او المستخلصات النباتية:

استخدمت طريقة National Committee for Clinical Laboratory Standard لتقييم التركيز المثبط الأدنى MIC من النواتج الايضية من لانواع بكتريا حامض اللاكتيك كل على انفراد او بصورة مشتركة وكذلك المستخلصات النباتية ضد عزلتي الجرثومة *S. pyogenes* من خلال تحضير المحلول الأساس من كل من النواتج الايضية او المستخلص في 4 مليلتر من الماء المقطر المعقم . ثم عملت التخافيف المتسلسلة المتضاعفة (Two Fold dilution) لكل منها التي كانت 10 و 20 و 40 و 80 و 160 و 320 و 640 و 1280ملغم/مل واخذ من كل تخفيف 1مل بعد ان تم تعقيمه باستخدام ورق الترشيح Millipore وأضيف إلى 9 مل من وسط

Muller Hinton Agar المعقم وصب في الطبق المعقم ثم ترك ليتصلب . تم تلقيح الأطباق المتصلبة والمحتوية على المستخلصات النباتية الثلاثة وبتراكيزها المختلفة بالعزلة الجرثومية *S. pyogenes* والمعدة بعد المقارنة مع التركيز 0.5 من محلول ماكفرلاند القياسي. ثم حضنت الأطباق عند 37°م لمدة 24 ساعة ثم قرأت النتائج . ان اقل تركيز من المستخلص يثبط نمو البكتريا يعُد هو التركيز المثبط الأدنى (MIC) .

3- 2- 9 دراسة القدرة التثبيطية للخلايا او النواتج الايضية من بكتريا حامض اللاكتيك او المستخلصات النباتية ضد عزلتي *S. pyogenes* :

اتبعت طريقة Agar well diffusion وذلك بعد ان تم تحضير الوسط الزرعي Muller Hinton Agar حيث استخدم منه تقريباً طبق ولقح الوسط بكمية من العالق الجرثومي من بكتريا *S. pyogenes* ثم نشرت باستخدام ناشر زجاجي معقم Spreader . ثم تركت الأطباق لفترة مابين 20- 30 دقيقة للتخلص من الرطوبة الزائدة فوق الاكار . بعدها تم أعداد الحفر باستخدام الثاقب المعدني المعقم ذا قطر

0.6 ملم أضيف 0.1 مل من كل من معلق الخلايا الحية من نوعي بكتريا حامض اللاكتيك منفردة او سوية التي تمت مقارنة عكارة نموها مع تركيز 0.5٪ من محلول ماكفرلاند القياسي وكذلك اضافة 0.1 مل من تراكيز النواتج الايضية من انواع بكتريا حامض اللاكتيك بالتراكيز 10 ، 20 و 40 ملغم/مل او المستخلصات النباتية من كل من أوراق الشاي وبذور الكلغان وبذور الحبة السوداء عند 25 و 50 و 100 ملغم/100مل وباستخدام الماصة الدقيقة وبواقع 4حفر لكل تركيز . بعد ذلك حضنت الأطباق عند 37°م لمدة 24 ساعة في الحاضنة . بعدها تم قياس منطقة التثبيط Inhibition Zone لكل تركيز من المستخلصات وسجلت النتائج علماً ان منطقة التثبيط هي المنطقة الخالية من النمو إضافة إلى قطر الحفرة (Perz *et al* , 1990).

3- 2- 10 التحليل الاحصائي :

تم تنفيذ التجرية بموجب التصميم العشوائي الكامل

(Complete Randomized Design) واجري تحليل التباين باستخدام النموذج الخطي العام(General Linear Model)، ضمن البرنامج الاحصائي الجاهز SAS، (2001) وفي حالة وجود فروقات معنوية فقد استخدم اختبار دنكن Duncan (1955) لتحديد معنوية الفروقات ما بين المتوسطات المختلفة عند مستوى احتمالية 0.05.


الفصل الرابع
النتائج والمناقشة

4- النتائج والمناقشة

4- 1 عزل وتشخيص بكتريا *Streptococcus pyogenes*

بعد أن تم اخذ مسحات (Sawbs) من 10 مرضى خمسة من مصابين باخماج العمليات والاخرى من المصابين بالتهاب اللوزتين (Tonsillitis).تم منها الحصول على عزلتين من بكتريا *S.pyogenes* سميت 1 و 2 بعد أن تم التعرف على خواصها المظهرية والمزرعية والبايوكيمائية إذ ظهرت المستعمرتين على الوسط أكار الدم Blood Agar بأنها كروية منتظمة بشكل سلاسل وكما في الجدول 4-1 وكانت أيضا موجبة لصبغة كرام وغير مكونة للسبورات وعديمة الحركة.

بينت الخواص المزرعية بان تحلل الدم كان من النوع β وكانت موجبة لاختبار الباستراسين وعند تنميتها في وسط أكار الدم عند درجة 10 و45 °م وجد أنها لا تنمو إلا عند 45°م وكذلك لم تكن لها القابلية على تحمل أملاح الصفراء عند تركيز 4.5 ٪.أما الاختبارات البايوكيمائية التي بينها الجدول 4-2 فقد وجد بان العزلتين كانتا سالبة لفحص الكتاليز والاوكسديز وقد تمكنت العزلتان من تخمير المصدر الكاربوهيدراتي عندما كان من السالسين والكلوكوز واللاكتوز ولم تتمكن من تخمير كل من الرايبوز و المانتول و الرافينور والانيولين.

الجدول(1-4) الفحوصات المظهرية والزرعية لعزلات النوع *Streptococcus pyogenes*

نوع الاختبار	اسم الاختبار		نتيجة الاختبار
الفحوصات المظهرية	شكل المستعمرات في وسط الدم الصلب		كروية كبيرة الحجم بشكل سلسلة
	التصبيغ بصبغة كرام		+
	التصبيغ بصبغة السبورات		-
	فحص الحركة		-
الفحوصات الزرعية	اختبار نوع تحلل الدم		β
	اختبار الباستراسين		+
	قابلية النمو عند ^{o}م	10	-
		45	+
	القابلية في تحليل أملاح الصفراء		-
	التحسس ضد SXT		مقاومة

العلامة(+) تعني موجبة الاختبار، العلامة(-) تعني سالبة الاختبار

الجدول (2-4) الفحوصات الكيموحيوية لعزلات النوع *Streptococcus pyogenes*

نوع الاختبار	اسم الاختبار		نتيجة الاختبار
الفحوصات الكيموحيوية	اختبار الكتاليز		-
	اختبار الاوكسيديز		-
	اختبار تخمر الكاربوهيدرات		
		المانيتول	-
		السالسين	+
		الانيولين	-

		الكلوكوز	+
		اللاكتوز	+
		الرايبوز	-
		الرافينوز	-

العلامة(+) تعني موجبة الاختبار، العلامة(-) تعني سالبة الاختبار

اتفقت نتائج التشخيص المظهري والمزرعي والبايوكيميائي مع ما حصلت عليه عبدالجبار، (2002) التي عزلت 12 عزله من مرضى التهاب البلعوم في مستشفيات الأطفال ومستشفى عام في مدينة بغداد ومع (Mora *et.al,* 2005) اللذين عزلوا نفس البكتريا من مرض التهاب الفم.

لقد أظهرت هذه البكتريا بأنها موجبة لصبغة كرام لاحتوائها على طبقة بسيطة من الدهون التي تزال بالكحول وتبقى محتفظة بصبغة البنفسج البلوري فتظهر باللون الأزرق الذي يعني بأنها موجبة لصبغة كرام كما أن السبب في كونها حساسة لمضاد الباستراسين يعود الى ظهور منطقة التثبيط حول قرص الباستراسين المثبت على الوسط، الذي كان قطر تثبيط 15 ملم وهي صفة مميزة لبكتريا *S.pyogenes* ذلك لان المجاميع الأخرى التابعة للمكورات تكون مقاومة لهذا المضاد أو حساسة بدرجة قليلة أي أن منطقة التثبيط تكون اقل من قطر 15 ملم.

كذلك لم تتمكن من النمو بوجود أملاح الصفراء لعدم قدرتها على تحمل الضغط الازموزي العالي كما تبين بان العزلتين كانتا سالبه لفحص الكتاليز والاوكسيديز وذلك من خلال عدم تكوين فقاعات من غاز O_2 على مستعمرات في الوسط بعد إضافة قطرتين من H_2O_2 3٪ ويعود ذلك الى عدم قدرة هذه البكتريا على إنتاج أنزيم الكاتاليز الذي يحلل البيروكسيد إلى ماء وأوكسجين (Myrvic and wiser , 1988).ويعود سبب تخمير البكتريا لبعض الكاربوهيدرات وذلك لامتلاكها جينات وراثية معينة تساعدها في أتمام هذا التخمر(Prescott,2005).

4- 2 عزل وتشخيص أنواع بكتريا حامض اللاكتيك:

بعد أن تم جمع نماذج الألبان المختلفة من الأسواق المحلية من علامات الصافي والبان الجامعة والمصنعة في البيوت في محافظة صلاح الدين والقيام بالعزل من هذه العينات فقد تم الحصول على نوعين من بكتريا حامض اللاكتيك وهي *Lactobacillus acidophilus* و *Bifidobacterium bifidium* التي تم تشخيصها اعتماداً على صفاتها المظهرية والزرعية والبايوكيميائية الخاصة لأنواع العزلات.

ظهرت المستعمرات على وسط الـ $MRS\text{-}CaCO_3$ الصلب بأنها ذات أشكال متعددة نجمية ودائرية و بيضوية و مغزلية بالنسبة *Lb.acidophilus* بينما كانت الـ*B.bifidum* عصوية متغايرة الشكل وقد تظهر أحيانا على شكل عصوي منتفخ من المركز وتنتظم سلاسلها بشكل حرف V وكذلك ظهرت حول المستعمرات هالات شفافة لتدل على انها من أنواع بكتريا حامض اللاكتيك، وعند القيام بالتصبيغ بصبغة كرام وصبغة السبورات واجراء فحص الحركة وجد أن كلا النوعين كان ايجابياً لصبغة كرام ولكنه غير مكون للسبورات وعديم الحركة كما مبين في الجدول 4-3.

وعند إجراء الاختبارات النوعية المزرعية لوحظ أن كلا النوعين لم يكن لهما القابلية على إنتاج الامونيا من الارجنين وعند تنميتها بدرجات حرارة 15، 37 و 45 ^{o}م وجد أن النوعين كان نموهما مثالياً عند درجة 37 ^{o}م وان الـ *B.bifidum* قادرة على النمو في 45 ^{o}م ولكن لم يسجل ظهور أي نمو سواء لـ *Lb.acidophilus* أو *B bifidum*.عند درجة 15^{o}م.ولكن وجد أن نوع البكتريا *Lb.acidophilus* قد تمكنت من النمو عند تركيز ملحي 4 و 6.5 ٪ بينما النوع *B bifidum*.لم يتحمل النمو إلا في تركيز ملحي 6.5 %.

الجدول (4- 3) الفحوصات المظهرية والزرعية لأنواع بكتريا حامض اللاكتيك

نوع الاختبار	اسم الاختبار	عزلات النوع ***Lactobacillus acidophilus***	عزلات النوع ***Bifidobacterium bifidium***
الفحوصات المظهرية	شكل المستعمرات	عصوية قصيرة او منحنية تترتب خلاياها بشكل سلاسل وفي بعض الاحيان مفردة او ثنائية	عصوية متغيرة الشكل، تظهر احيانا على شكل عصوي منتفخ من المركز وتنتظم سلاسلها بشكل حرف V
	التصبيغ بصبغة كرام	+	+
	التصبيغ بصبغة السبورات	-	-
	فحص الحركة	-	-
الفحوصات الزرعية	الأمونيا من تحلل الارجنين	-	-
	النمو عند درجات حرارة مختلفة		
	15 °م	-	-
	37°م	+	+
	45 °م	-	+
	النمو بتراكيز ملحية مختلفة		
	٪ 4	+	-
	٪ 6.5	+	+

العلامة(+) تعني موجبة الاختبار، العلامة(-) تعني سالبة الاختبار

أما الاختبارات البايوكيميائية فانه كما مبين في الجدول 4-4 حيث كان النوعين ذا استجابة سالبة لفحص الكتاليز وإنتاج الأسيتون من الكلوكوز ولكن تمكن النوع *Lb.acidophilus* من إنتاج الدكستران من السكروز وتخمير كل من الارابينوز و الكالاكتوز الفركتوز والسليليوز والمالتوز و اللاكتوز بينما لم تتمكن من تخمير كل من المليبايوز والتريهاليوز و السوربتول والمانتول و الرايبوز و الزايلوز أما بالنسبة لنوع *B bifidum*.فانه كان ذا قدرة على تخمير كل من الكالاكتوز و الفركتوز و اللاكتوز ولم تتمكن من تخمير الانواع الاخرى المدروسة من السكريات اعلاه.لقد لوحظ وجود تطابق في النتائج مع , Hammes وVogel (1995) الذين أكد إن هذه الأنواع تعود إلى جنس عصيات اللاكتيك.وكذلك تطابقت الصفات المذكورة مع ما ذكره Holt واخرون، (1994).

لقد وجد أن هذين النوعين من البكتريا غير متحركتان لعدم امتلاكهما الاسواط، ويعتقد إن النوع *Lb.acidophilus* تمكن من أن يتحمل الضغط الازموزي العالي، كذلك عدم قدرته على إنتاج الأمونيا التي يمكن ان تكون عائدة الى الصفات الوراثية المتعلقة بها.(1986 Wesiss and KanlderوVescovo et al 1996).

الجدول (4-4) الفحوصات البايوكيمياوية لأنواع بكتريا حامض اللاكتيك

نوع الاختبار	اسم الاختبار	عزلات النوع *Lactobacillus acidophilus*	عزلات النوع *Bifidobacterium bifidium*
الفحوصات البايوكيماوية	اختبار الكتاليز	-	-
	إنتاج الدكستران من السكروز	+	-
	إنتاج الأسيتون من الكلوكوز	-	-
	تخمير السكريات		
	Arabinose	+	-
	Ribose	-	-
	Xylose	-	-

+	+	Galactose		
+	+	Fructose		
-	-	Mannitol		
-	-	Sorbitol		
-	+	Cellobiose		
-	+	Maltose		
+	+	Lactose		
-	-	Melibiose		
-	-	Trehalose		

العلامة(+) تعني موجبة الاختبار، العلامة(-) تعني سالبة الاختبار

4- 3 الكشف الكيميائي عن المجاميع الفعالة للمستخلصات النباتية:

بعد أن تم الحصول على النباتات الطبية من مناطق مختلفة وتنظيفها وتجفيفها وطحنها واستخلاصها للحصول منها على المستخلص المائي منها لكل من بذور الكلغان والحبة السوداء و أوراق الشاي الأخضر وعند إجراء الفحوصات المختبرية لمعرفة المواد الفعالة تبين إن نتائج الكشف الكيميائي للمجاميع الفعالة لمستخلص الكلغان المبينة في جدول(4- 5) تشير إلى احتوائه على كل من الراتنجات و الصابونيات و التانينات والقلويدات و الكلايكوسيدات و الفينولات والكومارين والفلافونات.أما بالنسبة لمستخلص بذور الحبة السوداء ومستخلص أوراق الشاي الأخضر فإنها امتازت باحتوائها على جميع المواد الفعالة الموجودة في الكلغان عدا التانينات والقلويدات حيث يحتوي كل منهما على الراتنجات والصابونيات و الكلايكوسيدات و الفينولات والفلافونات والكومارين.

اتفقت النتائج بالنسبة لمستخلص الكلغان مع ما ذكره PostWhite وآخرون، (2007) الذين وجدوا إن مستخلصات الكلغان قد احتوت على الفلافونات والفينولات و الكلايكوسيدات و الراتنجات واتفقت نتائج الكشف لبذور الحبة السوداء AL-ghamdi and Randhawa (2002) الذين وجدوا بعد التحليل الكيميائي لبذور الحبة السوداء مع ما وجده كانت متشابهه مع ما ذكر في نتائج الدراسة كذلك

اتفقت النتائج للمواد الفعالة لأوراق الشاي الأخضر مع ما أكده Harborne، (1984).وان السبب في وجود هذه المواد الفعالة يعود إلى طبيعتها البيولوجية وتركيبها الكيميائي الذي جعل من هذه النباتات أهمية طبية.

الجدول (4- 5) فحوصات تحديد المواد الفعالة في انواع المستخلصات النباتية

نوع المستخلص المائي للعينات	الراتنجات	الصابونيات	القلويدات	التانينات	الكلايكوسيدات	الفينولات	الفلافونات	الكومارين
بذور حبة السوداء	+	+	-	-	+	+	+	+
بذور الكلفان	+	+	+	+	+	+	+	+
أوراق الشاي الأخضر	+	+	-	-	+	+	+	+

العلامة(+) تعني موجبة الاختبار، العلامة(-) تعني سالبة الاختبار

4- 4 تأثير بعض العوامل على النمو وانتاج الستربتولايسين O من عزلة *Streptococcus pyogenes*

4- 4- 1 تأثير درجة الحرارة

يبين الجدول (4-6) تأثير درجات الحرارة المختلفة في الأعداد الكلية و المقدرة في إنتاج الستربتولايسين O من قبل عزلات البكتريا *Streptococcus pyogenes* عند تنميتها على آكار الدم Blood Agar عند رقم هيدروجيني 7.0 ولمدة24 ساعة.

بينت النتائج أن تنمية العزلتين *S.pyogenes* 1 و2 في درجات حرارة 20، 25، 30، 35، 40 و45 ^{o}م كانت متساوية لكلا العزلتين ولم يظهر فرق معنوي بينهما عند مستوى (P<0.05) كذلك لوحظ ان النمو كان أفضل ما يكون عند درجة 30 و

35°م الذي أعطى أعداد كلية 2.6×10^{7} و 3.4×10^{8} وحدة تكوين مستعمرة / مل على التوالي في العزلة 1 بينما لوحظ ان الانخفاض أو الارتفاع عن درجة 30 و 35 °م قد تسبب في انخفاض النمو اذا كانت الأعداد الكلية عند درجات حرارة 20 و 25 و40 °م هي 1.8×10^{2} و 1.4×10^{5} و 2.1×10^{6} و.ت.م/مل على التوالي.بينما اعطت العزلة 2 الاعداد الكلية 2.03×10^{2} و 1.7×10^{5} و2.1×10^{7} و 2.9×10^{8} و2.1 و.ت.م/مل عند الدرجات الحرارية 20، 25، 30، 35 و 40 °م على التوالي.

أما قابلية العزلتين من بكتريا *S.pyogenes* 1 و 2 على إنتاج الستربتولايسينO في درجات حرارة مختلفة فقد حصل أعلى إنتاج منه في العزلة 1 عند درجة 35 تلتها الدرجة 40 و 30 °م إذا كانت قيم إنتاجه 1.5 و 0.1 و 0.8 وحدة/ مل على التوالي ولم يحصل إنتاج للستربتولايسين O عند 20 و 25 م° وفي العزلة 2 فقد كان أعلى إنتاج من الستربتولايسينO عند درجة حرارة 35 تلتها الدرجات 30 و 40 و 25 °م إذا كانت قيم إنتاجه 1.1 و 0.6 و 0.3 و 0.2 وحدة / مل على التوالي.

اتفقت نتائج النمو للأعداد الكلية مع ما ذكره Pichichero (1995) في ان قدرة البكتريا على النمو بدرجات حرارية مختلفة كانت مختلفة مع ارتفاع أو انخفاض درجات الحرارة.ويعتقد أن السبب في تأثير درجات الحرارة على نمو العزلتين من الـ*S.pyogenes* مرتبطاً بشكل أساس بطبيعتها الفسلجية حيث أنها محبة للحرارة المتوسطة Mesopilhes وبهذا فإنها تتأثر بشكل كبير بالانخفاض الشديد أو الارتفاع عن درجة الحرارة الملائمة لنموها حيث أن الانخفاض أو الارتفاع يؤثر بشكل سلبي على فعاليتها الانزيمية والايضية وبالتالي في قدرتها على إنتاج الستربتولايسين O (Alouf , 1984).

الجدول (4- 6) تأثير درجات الحرارة المختلفة في الأعداد الكلية وإنتاج الستربتولايسين O من عزلات البكتريا *Streptococcus pyogenes*

درجات حرارة التنمية ($م^{0}$)	العزلة *Str.pyogenes* 1 ❖		العزلة *Str.pyogenes* 2	
	العدد الكلي خلية /مل	الستربتولايسين O (وحدة / مل)	العدد الكلي خلية /مل	الستربتولايسين O (وحدة / مل)
20	$1.8^{e} \times 10^{2}$	-	$2.03^{d} \times 10^{2}$	-
25	$1.4^{d} \times 10^{5}$	-	$1.7^{c} \times 10^{5}$	0.2^{c}
30	$2.6^{b} \times 10^{7}$	0.8^{b}	$2.1^{b} \times 10^{7}$	0.6^{b}
35	$3.4^{a} \times 10^{8}$	1.5^{a}	$2.9^{a} \times 10^{8}$	1.1^{a}
40	$2.1^{c} \times 10^{6}$	0.1^{ab}	$2.1^{c} \times 10^{5}$	0.3^{c}
45	-	-	-	-

a-e الاحرف المختلفة في العمود الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05

الاعداد الكلية الاولية كانت 1.5×10^{5} لكلا العزلتين وكانت ظروف التنمية هي عند 35°م لمدة 24 ساعة والرقم الهيدروجيني 7.

4- 4- 2 تأثير مستويات الرقم الهيدروجيني:

الجدول (4- 7) يوضح تأثير المستويات المختلفة من الرقم الهيدروجيني عند 5 و 5.5 و 6 و 6.5 و7 و 7.5 و 8 في النمو وإنتاج الستربتولايسين O من عزلتي بكتريا *Streptococcus pyogenes*، بينت النتائج بان أفضل تركيز من الرقم الهيدروجيني الذي حصل عنده أعلى مستوى معنوي عند ($P< 0.05$) هو عند 6.5 تلاه التركيز 7 و 7.5 إذ كانت الأعداد الكلية من العزلة 1 3.6 و 3.5 و 3.2 × 10^{8} على التوالي و قد انخفضت الأعداد معنوياً مع زيادة تركيز الرقم الهيدروجيني إلى 8 وكذلك عند تخفيضه إلى 6 و 5.5 و 5.

كذلك الحال في العزلة 2 كان أفضل تركيز من الرقم الهيدروجيني الذي حصل عنده أعلى أعداد كلية معنوياً عند 6.5 و7 التي كانت 3.1 و 3.0 و $\times10^{8}$ على التوالي وحصل انخفاض معنوي في الأعداد الكلية للعزلة المشار إليها 2 عند زيادة الرقم الهيدروجيني إلى 7.5 و 8 أو الانخفاض إلى 5 و 5.5.أما عزلتي بكتريا *S.pyogenes* 1و2 في إنتاج الستربتولايسين O في تراكيز مختلفة من الرقم الهيدروجيني، فقد حصل أعلى إنتاج في العزلة 1 عند 6.5 تلاه عند التراكيز 7 و 7.5 و 6 و 8 و 5.5 إذا كانت قيم إنتاجه 1.7 و 1.6 و 1.4 و 1.3 و 1 و 0.4 وحدة/مل على التوالي.وفي العزلة 2 فقد كان أعلى إنتاج من الستربتولايسين عند 6.5 وتلاه 7 و 7.5 و 8 و 5.5 و 5 إذا كانت قيم إنتاجه هي 1.4 و 1.3 و 1.1 و 1.0 و 0.6 و 0.2 وحده/مل على التوالي.اتفقت النتائج مع ما ذكره Alouf (1962) في ان التغيرات في الرقم الهيدروجيني يؤثر على أعداد و قابلية البكتريا على إنتاج الستربتولايسين.يعتقد أن السبب الرئيس لوجود أفضل نمو عند الرقم الهيدروجيني 6.5- 7 هو بسبب تركيبتها في العيش في الوسط المتعادل ولهذا لوحظ انخفاض النمو مع ازدياد أو نقصان الرقم الهيدروجيني عن الرقم الهيدروجيني المثالي. (Bernhiemer , 1972).

الجدول (4- 7) تأثير مستويات الرقم الهيدروجيني المختلفة في النمو وإنتاج الستربتولايسين O من عزلات البكتريا *Streptococcus pyogenes*

مستويات الرقم الهيدروجيني	العزلة *S.pyogenes* 1		العزلة *S.pyogenes* 2	
	العدد الكلي خلية/ مل	الستربتولايسين O (وحدة / مل)	العدد الكلي خلية/ مل	الستربتولايسين O (وحدة / مل)
4.5	-	-	-	-
5	$1.1^{f} \times 10^{3}$	-	$1.3^{e} \times 10^{5}$	0.2^{d}
5.5	$1.3^{e} \times 10^{4}$	0.4^{d}	$1.5^{e} \times 10^{8}$	0.6^{c}
6	$2.8^{c} \times 10^{7}$	1.3^{b}	$2.2^{c} \times 10^{7}$	1.0^{b}
6.5	$3.6^{a} \times 10^{8}$	1.7^{a}	$3.1^{a} \times 10^{8}$	1.4^{a}
7	$3.5^{a} \times 10^{8}$	1.6^{a}	$3.0^{a} \times 10^{8}$	1.3^{a}
7.5	$3.2^{b} \times 10^{8}$	1.4^{ab}	$3.3^{b} \times 10^{7}$	1.3^{a}
8	$2.0^{d} \times 10^{7}$	1.0^{c}	$1.8^{d} \times 10^{7}$	1.1^{b}

a-fالاحرف المختلفة في العمود الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05

❖ الأعداد الكلية الأولية كانت 1.5×10^{8} لكلا العزلتين وكانت ظروف التنمية عند 35°م لمدة 24 ساعة.

4- 4- 3 تأثير Fe_2O_3:

ان تأثير التراكيز المختلفة من Fe_2O_3 في الأعداد الكلية وإنتاج الستربتولايسينO من عزلتي البكتريا Streptococcus pyogenes 1و2 عند التنمية بدرجة 35°م لمدة 24 ساعة ورقم هيدروجيني 7 قد وضحها الجدول 4-8.

بينت النتائج ان أفضل تركيز من Fe_2O_3 الذي حصل عنده أعلى مستوى معنوي ($P< 0.05$) من النمو كان عند 2.5 ملغم / مل حيث كانت 3.2×10^{8} تلاه التركيز 1.25 و 5.0 و 10.0 ملغم/مل إذا كانت الأعداد الكلية لعزلة 1 هي

2.4×10^{7} و7×10^{6} و 2.0×10^{6} و.ت.م/مل على التوالي وكانت الأعداد للعزلة 2 حيث كانت 3.10×10^{7} و 2.11×10^{7} و 2.10×10^{6} و 2.10×10^{3} على التوالي.

أما قابلية العزلتين S.pyogenes 1و2 في إنتاج الستربتولايسين O في تراكيز مختلفة من Fe_2O_3 فقد حصل أعلى إنتاج من العزلة 1 و 2 عند التركيز 2.5 تلاه عند التركيز 5.0 و 1.25 و 10.0 حيث أعطت العزلة 1 فعالية منه عند 1.6 و 1.3 و 1.1 و 0.5 وحدة/مل على التوالي وكانت قراءات العزلة 2 هي 1.3 و 0.9 و 0.9 و 0.8 وحدة/مل على التوالي.

اتفقت النتائج مع ما أكده Altemier (1998) في ان تأثير الحديد في نمو S.pyogenes وإنتاج الستربتولايسين يمكن ان يرجع الى احتياج الخلايا إلى Fe_2O_3 في الفعاليات الايضية للخلية وحاجتها لأوكسيد الحديدوز في نموها وبنسبة ضئيلة جدا وان زيادتها او قلتها عن المستوى المثالي فانه يمكن ان يكون ذا تأثير في ايض الخلية البكتيرية.

الجدول (4- 8) تأثير تراكيز Fe_2O_3 المختلفة في الأعداد الكلية وإنتاج الستربتولايسين من عزلات البكتريا *Streptococcus pyogenes*

تركيز Fe_2O_3 في الوسط الزرعي (ملغم / مل)	العزلة *S.pyogenes* 1		العزلة *S.pyogenes* 2	
	العدد الكلي خلية/ مل	الستربتولايسين O (وحدة / مل)	العدد الكلي خلية/ مل	الستربتولايسين O (وحدة / مل)
1.25	2.4×10^{7} b	1.1^{b}	2.11×10^{7} b	0.9^{b}
2.50	3.2×10^{8} a	1.6^{a}	3.10×10^{7} a	1.3^{a}
5.00	2.0×10^{6} c	1.3^{ba}	2.10×10^{6} c	0.9^{b}
10.00	1.7×10^{3} d	0.5^{c}	2.10×10^{3} d	0.8^{b}

a-d الاحرف المختلفة في العمود الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05.

❖ الأعداد الكلية الأولية كانت 1.5×10^{5} لكلا العزلتين وكانت ظروف التنمية عند 35°م لمدة 24 ساعة ورقم هيدروجيني 7.

4- 5 تاثير انواع بكتريا حامض اللاكتيك في الأعداد الكلية وإنتاج الستربتولايسين O من عزلتي بكتريا *S.pyogenes*:

إن القدرة التثبيطية لنوعي بكتريا حامض اللاكتيك من نوع *Lb.acidophilus* و *B.bifidum* ضد عزلتي بكتريا *S.pyogenes* بعد تنميتها على 35 °م لمدة 24 ساعة ورقم هيدروجيني7.0 قد تم توضيحها في الجدول (4-9).بينت النتائج امتلاك النوع *Lb.acidophilus* فاعلية تثبيطية معنوية ($P<0.05$) ضد العزلتين 1و2 من بكتريا *S.pyogenes* عند إضافتها إلى وسط التنمية بحجم 1 مل حيث أدى إلى تثبيط الأعداد الكلية للعزلتين 1و2 لتصبح اعدادها 1.7 و 1.9×10^{3} و.ت.م/ مل على التوالي.

كذلك سبب وجود هذا النوع من بكتريا حامض اللاكتيك في تثبيط فعالية العزلتين في إنتاج الستربتولايسين O حيث كان التثبيط كاملاً لإنتاج الستربتولايسين O في العزلة 1 بينما كان التثبيط ليصبح انتاجه بمقدار 0.3 وحدة/ مل من العزلة 2.

كذلك الحال عند تنمية نوع بكتريا حامض اللاكتيك *B.bifidum* فانه سبب في تثبيط الاعداد الكلية معنوياً من عزلتي بكتريا *S.pyogenes* 1و 2 ليصبح 1.1و 1.4×10^{3} و.ت.م/مل على التوالي وكان تثبيطها كاملاً لانتاج الستربتولايسين O من العزلتين وان استخدام العزلتين المذكورتين من بكتريا حامض اللاكتيك سوية في التنمية ضد عزلتي بكتريا *S.pyogenes* قد سببت في التثبيط الكامل لنموها وكذلك لانتاج الستربتولايسين O منهما ان هذه النتائج قد اتفقت مع ما ذكره Desmazeaud.(1996) في ان بكتريا حامض اللاكتيك تمتلك قابلية تثبيطية ضد بعض أنواع البكتريا و الفطريات وكما اتفق مع ما وجده Muhsen (2007) في قابلية جراثيم عصيات حامض اللاكتيك *Lb.acidophilus* في العلاج و الوقاية من الإصابة بالـ Salmonelloses.

الجدول (4- 9) تاثير أنواع بكتريا حامض اللاكتيك على الأعداد الكلية وإنتاج الستربتولايسين O من عزلتي البكتريا *Streptococcus pyogenes*

أنواع بكتريا حامض اللاكتيك (1 مل)	العزلة *S.pyogenes* 1		العزلة *S.pyogenes* 2	
	العدد الكلي و.ت.م/ مل خلية/ مل	الستربتولايسين O (وحدة / مل)	العدد الكلي و.ت.م/ مل خلية/ مل	الستربتولايسين O (وحدة / مل)
Lb.acidophilus	$1.7^{a} \times 10^{3}$	----	$1.9^{a} \times 10^{3}$	0.3
B.bifidum	$1.1^{b} \times 10^{3}$	----	$1.4^{b} \times 10^{3}$	----
Lb.acidophilus *B.bifidum* +	----	----	----	----

a-b الاحرف المختلفة في العمود الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05

❖ الأعداد الكلية الأولية كانت 1.5×10^{5} لكل نوع من الأنواع وكانت ظروف التنمية عند 35^{o}م لمدة 24 ساعة ورقم هيدروجيني 7.

كذلك اتفقت مع ما أكداه Lee and Salminen(2009) في ان النوع *B.bifidum* يمتلك فعالية تثبيطية ضد معظم الأحياء المجهرية ويمكن اعتبارها مما ذكر بانها من البكتريا المفيدة صحياً.

كذلك اتفقت مع ما ذكره Schell (2002) في ان عصيات *B.bifidum* تستخدم كمعزز حيوي شائع الاستعمال نتيجة لتواجدها في الامعاء الغليظة واستعمارها الطبقة الطلائية مانعة بذلك الجراثيم غير المرغوب بها من الالتصاق ببطانة الأمعاء من خلال التزاحم معها.

4- 6 تحديد التركيز المثبط الادنى من النواتج الايضية لبكتريا حامض اللاكتيك والمستخلص النباتي:

يبين الجدول (4- 10) التركيز المثبط الادنى للنواتج الايضية بصورة منفردة او سوية لكل من نوعي بكتريا حامض اللاكتيك او المستخلصات النباتية ضد عزلتي بكتريا *Streptococcus pyogenes* عند تنميتها على وسط Muller Hinton Agar لمدة 24 ساعة.بينت النتائج ان التركيز المثبط الادنى من النواتج الايضية لبكتريا حامض اللاكتيك سواء كانت منفردة او سوية هي عند 40 ملغم/مل، اما في حالة المستخلصات المائية للنباتات فقد كان عند 200 ملغم/100 مل من الوسط الزرعي وللانواع الثلاثة من النباتات المستخدمة في الدراسة.ان الاختلاف في التراكيز الدنيا المثبطة بين النواتج الايضية والمستخلصات النباتية يمكن ان يكون معتمدا على الاختلافات في محتوى هذه المواد من المركبات الفعالة المثبطة او القاتلة لعزلات بكتريا *Streptococcus pyogenes*.

الجدول(4- 10) التركيز المثبط الادنى من النواتج الايضية لبكتريا حامض اللاكتيك والمستخلص المائي للنبات

أنواع المستخلصات المائية وبكتريا حامض اللاكتيك	التراكيز المستخدمة (ملغم /مل)	العزلة 1 *s.pyogenes*	العزلة 2 *S.pyogenes*
		التركيز المثبط الادنى	التركيز المثبط الاعلى
Lb.acidophilus	10	+	+
	20	+	+
	40	+	+
	60	-	-
B.bifidum	10	+	+
	20	+	+
	40	+	+
	60	-	-

Lb.acidophilus *B.bifidum* +	10	+	+
	20	+	+
	40	+	+
	60	-	-
بذور الحبة السوداء	25	+	+
	50	+	+
	100	+	+
	200	-	-
بذور الكلغان	25	+	+
	50	+	+
	100	+	+
	200	-	-
أوراق الشاي الأخضر	25	+	+
	50	+	+
	100	+	+
	200	-	-

العلامة(+) تعني موجبة الاختبار، العلامة(-) تعني سالبة الاختبار

4- 7 تأثير النواتج الايضية من أنواع بكتريا حامض اللاكتيك في الأعداد الكلية وإنتاج الستربتولايسين O من عزلتي بكتريا *S.pyogenes*:

ان الفعالية التثبيطية لنواتج الايضية لكل من *Lb.acidophilus* أو *B.bifidium* كل على حدة او عند استخدامهما سوية بالتراكيز 10، 20 و 40 ملغم/مل ضد عزلتي من *S.pyogenes* بعد تنميتها عند 35 °م لمدة 24 ساعة ورقم هيدروجيني 7.0 قد وضحها الجدول (4-11).

بينت النتائج امتلاك النواتج الايضية للأنواع البكترية المذكورة أعلاه فاعلية تثبيطية معنوية ضد العزلة 1 من *S.pyogenes* عند تركيز 10 ملغم /مل حيث كان اقل تثبيط عند هذا التركيز لنوع لبكتريا *Lb.acidophilus* تلاها

B.bifidium ثم التداخل بين النوعين حيث كانت الاعداد الكلية 3.7 و 3.1×10^7 و 4.2×10^6 و.ت.م/ مل على التوالي.

أما عند التركيز 20 ملغم/مل فقد اصبحت الاعداد الكلية 1.5 و 2.4×10^3 و 2.2×10^2 و.ت.م/ مل على التوالي للمعاملات الثلاثة *Lb.acidophilus* و *B.bifidum* والتداخل ما بينهما بينما حصل تثبيط كامل للعدد الكلي لنمو البكتريا من عزلة 1 عند تركيز 40 ملغم/مل للمعاملات الثلاث.

أما مقدرة عزلة الـ *S.pyogenes* 1 على إنتاج الستربتولايسين O فلم يظهر معه فرقاً معنوياً بين النوعين لوحدهما أو سوية عند التركيز 10ملغم/مل حيث كان الانتاج 0.8 و 0.7 و 0.8 وحدة /مل على التوالي.

أما عند التركيز 20 و 40 ملغم/مل فلم يحصل أي إنتاج للستربتولايسين O بعد المعاملات الثلاث الانواع *Lb.acidophilus* او *B.bifidium* او كليهما *ما* عدا في حالة النواتج الايضية من *Lb.acidophilus* قد انتج بمقدار 0.2 وحدة / مل عند التركيز 20 ملغم /مل.

أما الفعالية التثبيطية لمعاملات *Lb.acidophilus* و *B.bifidum* كل على حدة او سوية ضد العزلة 2 من *S.pyogenes* عند التركيز 10 ملغم/مل فانها كانت منخفضة في فعاليتها عند المعاملة بالنوع لـ *Lb.acidophilus* تلاها النوع *B.bifidium* ومن ثم النوعين سوية حيث كانت الأعداد الكلية 1.9×10^6 و 3.7 و 4.7×10^5 و.ت.م/مل على التوالي وكانت عند التركيز 20 ملغم/مل 1.4 و 1.9×10^2 و 1.2×10 و.ت.م /مل على التوالي ولم يسجل أي ظهور للنمو عند التركيز 40 ملغم/مل.

أما قابلية العزلة 2 من بكتريا *S.pyogenes* على إنتاج الستربتولايسينO في التراكيز المختلفة من النواتج الايضية، فقد حصل أعلى إنتاج عند تركيز 10 ملغم/مل مع كل من النوع *Lb.acidophilus* تلاه *B.bifidium* ثم عند وجودهما *سوية* إذ كانت قيم إنتاجه على التوالي 1.1 و 0.7 و 0.5 وحدة/ مل على التوالي ولم يسجل ظهور أي إنتاج للستربتولايسين O من العزلة 2 مع التراكيز الاخرى.

اتفقت النتائج مع ما وجده Tejud-Simon واخرون (1999) الذين اشاروا إلى ان تناول اللبن الرائب الحاوي على المعززين الحيويين *Lb.acidophilus* و*B.bifidum* كان ذا فعالية أفضل في تحفيز الاستجابة المناعية المتمثلة بـ IgA.

ان طريقة أنتاج المواد الايضية او إفرازها هي إحدى الآليات التي تقوم بها أنواع بكتريا حامض اللاكتيك في الاستبعاد التنافسي للأحياء المجهرية المرضية (Rofle,1991)، إذ ان المواد المثبطة للمايكروبات التي تفرزها بكتريا حامض اللاكتيك تستطيع ان تقتل او تثبط نمو الجراثيم المرضية لأنواع مختلفة او حتى للعزلات المختلفة العائدة لنفس النوع من العصيات(Iglewski and Gerhardt , 1978).

الجدول (4- 11) القدرة التثبيطية للنواتج الايضية من أنواع بكتريا حامض اللاكتيك في الأعداد الكلية وإنتاج الستربتولايسين O من عزلات بكتريا *Streptococcus pyogenes*

أنواع بكتريا حامض اللاكتيك (1 مل)	التراكيز المستخدمة (ملغم /مل)	العزلة *S.pyogenes* 1		العزلة *S.pyogenes* 2	
		العدد الكلي و.ت.م/ مل	الستربتولايسين O (وحدة / مل)	العدد الكلي و.ت.م/ مل	الستربتولايسين O (وحدة / مل)
Lb.acidophilus	10	10 ×7 [a].3 7	0.8[a]	10 ×9 [a].1 6	1.1 [a]
	20	10 ×5 [e].1 3	0.2 [b]	[3]10 ×4 [e].1	----
	40	----	----	----	----
B.bifidum	10	10 ×1 [b].3 7	0.7[a]	[5]10 ×7 [c].3	0.7 [b]
	20	10 ×4 [d].2 3	----	[3]10 ×9 [d].1	----
	40	----	----	----	----
Lb.acidophilus + *B. bifidum*	10	10 ×2 [c].4 6	0.8 [a]	10 ×7 [b].4 5	0.5 [c]
	20	[2] 10 ×2 [f].2	----	10 ×2[f].1	----
	40	----	----	----	----

a-f الاحرف المختلفة في العمود الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05

تمتلك العصيات القدرة على أنتاج مواد ايضيه مختلفة لها تأثير قاتل او تثبيطي على الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام . الخمائر والطفيليات والفايروسات (Satio, 2004)والتي منها المواد المضادة للجراثيم المسماة البكتريوسينات (Bacteriocins) التي لها مفعول قاتل bacteriocidal ضد أنواع أخرى من الجراثيم مثل *S.pyogenes* ,, *Clostridium spp* , *Clostridium perfrenges* و*Bacillus cereus* , *Staphylococcus spp* (Montville and Kaiser , 1993) ويكون فعلها من خلال قابليتها على الارتباط بمواقع محددة على جدار الخلية (Piard et al., 1993).

تنتج البكتريوسينات بواسطة العديد من الأحياء المجهرية ويشفر لها بواسطة البلازميدات (Mishra and Lambert , 1996) . ويعد أنتاج البكتريوسينات من قبل العصيات احد وسائل الإقصاء التنافسي لتلك الجراثيم (Joerger , 2003)وكذلك يمكن ان يكون فعل البكتريوسينات قاتلا من خلال مقدرتها على الارتباط بمستلمات الخلايا المتخصصة مما يسبب سرعة التدفق غير المتخصص للأحماض الامينية والايونات موجبة الشحنة فينتج عنه تمزق الغشاء الخلوي وموت الخلايا الحساسة (1996 Lambert , Mishra).

كما يمكن ان يكون الفعل المثبط من خلال انتاج الحوامض العضوية وتعد الأحماض العضوية النواتج النهائية الرئيسة لعملية تخمر الكاربوهيدرات من قبل عصيات حامض أللاكتيك . حيث تنتج حامض اللاكتيك بينما تنتج عصيات الـ *bifidobacteria* كل من Lactic acid , Acetic acid وبنسبة 2:3 (Baron et al., 1989).ان هذه الأحماض العضوية تعمل على خفض مستوى الرقم الهيدروجيني مثبطة بذلك نمو الجراثيم المرضية، فضلا عن تأثيرها القاتل في تلك الجراثيم لاسيما السالبة لصبغة كرام مثل الأنواع *Salmonella, E.coli, H.pylori* إضافة للإصابات الفطرية من الجنس Candida و الفايروسية

وقد أشار (Sanders and Klaeohamme , 2001) Vuyst and Vandamm (1994) إلى ان هذه النواتج الايضية تعد من أهم الفعاليات التضاديه التي تقوم بها العصيات والتي لها تأثير واسع في كل من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام.

ان الآلية التي تعمل بها الأحماض العضوية المنتجة من قبل عصيات حامض اللاكتيك فضلا عن خفض مستوى الرقم الهيدروجيني لوسط النمو فأنها تسبب زيادة نفاذيه الغشاء الخلوي للخلايا الجرثومية غير المقاومة للحامض ثم الدخول إلى داخل تلك الخلايا مؤثرة بذلك على العمليات الايضية الضرورية لنموها، مثل عملية انتقال المواد الأولية Substrates translocation ، وعمليات الفسفرة التأكسدية Oxidative Phosphorelation فتؤدي إلى تعطيلها وخفض مستوى الرقم الهيدروجيني داخل الخلية الجرموثية (Lgungf andWadstrom , 2006 and Smulder *et al.*, 1986) . ان كمية الحوامض المنتجة تعتمد على نوع العصيات المنتجة لها وعلى نوعية المواد الغذائية والظروف البيئة للوسط الذي تنمو فيه أنواع العصيات (Condon , 1987) . إذ ان القابلية التثبيطية للعصيات تزداد مع زيادة كمية الحامض المنتجة منها وبالتالي التثبيط للجراثيم الممرضة الحساسة للحامضية والموجودة في نفس البيئة (Beard , 1980).

ان تثبيط نوع بكتريا حامض اللاكتيك يمكن ان يكون من الفعل التأزري بين حامض الخليك وحامض اللاكتيك حيث يعمل الأول على خفض الرقم الهيدروجيني ويزيد الثاني من سميه الوسط وهذا الفعل التأزري يمنع نمو العديد من الجراثيم المرضية لاسيما من الانواع السالبة لصبغة كرام
(Adam and Hall , 1988 and Klaenhammer , 2000).

فضلاً عما ذكر فان بكتريا حامض اللاكتيك تمتلك القابلية التثبيطية من خلال انتاجها لبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وتعد العصيات اللاكتيك المحبة للحموضة *Lb.acidophilus* الأعلى إنتاجية من بين أنواع عصيات اللاكتيك الأخرى (Atlas *et al.*, 1995) المتواجدة في مهبل اغلب النساء السليمات والتي تمتلك تأثيراً واقيا ضد الاصابات المايكروبية (Saito , 2004).

إذ تقوم عصيات حامض اللاكتيك بإنتاج H_2O_2 عند وجود الأوكسجين من خلال عمل الأنزيمات التي تعرف flavoprotein Oxidases او من خلال (Nicotinamide adinine dinuclotide) Peroxidase NAD (Codon , 1987) مؤدية في تجمع بيروكسيد الهيدروجين في وسط النمو وبذلك تزداد كميته إلى الحد الذي يصبح فيه ذا تأثير قاتل او مثبط لنمو الأحياء المجهرية الأخرى التي تكون غير قادرة على أنتاج أنزيم البيروكسديز (Vuyst and Vandamme , 1994).

4- 8 تأثير المستخلصات النباتية في الأعداد الكلية وإنتاج الستربتولايسين O من عزلتي بكتريا ***S.pyogenes***:

يبين الجدول (4-12) القدرة التثبيطية لأنواع المستخلصات النباتية ضد عزلتي من بكتريا *S.pyogenes* عند التراكيز 25 و 50 و 100 ملغم/100مل حيث تبين ان التركيز 25 ملغم/100مل من بذور الحبة السوداء وبذور الكلغان واوراق الشاي الاخضر كان اقل فعالية معنوية ($p<0.05$) للتثبيط وكان عندها العدد الكلي للعزلة 1 من *S.pyogenes* هو 3.6×10^3 و 9.1و6.0×10^5 و.ت.م/مل على التوالي عند هذا التركيز.

أما بالنسبة لتأثيره في إنتاج الستربتولايسين O فقد كانت قيم إنتاجه 0.7 و 0.8 وحدة/مل في كل من بذور الكلغان و أوراق الشاي الأسود ولم يحصل أي إنتاج بعد المعاملة ببذور الحبة السوداء.

في حين اظهرت الفعالية التثبيطية للمستخلصات اعلاه عند التركيز 50 ملغم/100مل فرقاً معنوياً حيث كانت الأعداد الكلية للعزلة 1 هي 1.5 و 3.0 و 3.1×10^3 و.ت.م /مل على التوالي ولم يكن هنالك إنتاج للستربتولايسين O عند هذا التركيز بينما لوحظ ان التركيز 100ملغم/100مل كان الاكفأ معنوياً في فعاليته التثبيطية ولم يلاحظ حصول نمو للبكتريا و إنتاج الستربتولايسينO من عزلة بكتريا *S.pyogenes*.

أما الفعالية التثبيطية للتراكيز المختلفة من المستخلصات النباتية المذكورة ضد العزلة *S.pyogenes* 2 فقد لوحظ ان اقل فعالية تثبيطية معنوية ($P<0.05$) كانت عند التركيز 25 ملغم/100مل من قبل اوراق الشاي الأخضر تلتها بذور الكلغان ثم بذور الحبة السوداء حيث كان الأعداد الكلية هي 5.0×10^{6} و 3.5×10^{5} و 4.1×10^{4} و.ت.م /مل على التوالي وكانت قيم إنتاج الستربتولايسين O لعزلة 2 من *S.pyogenes* هي 1.0 و 0.9 و 0.5 وحدة /مل لاوراق الشاي الأخضر وبذور الكلغان و الحبة السوداء على التوالي.

اما التركيز 50 ملغم/100مل فقد كان له تأثير تثبيطي كامل من مستخلص أوراق الشاي الأخضر أما مستخلص بذور الحبة السوداء وبذور الكلغان فقد كانت عنده الاعداد المايكروبية من عزلة بكتريا *S.pyogenes* عنده هي 1.3و 1.9×10^{2} وت م/مل على التوالي.أما قابلية العزلة 2 من بكتريا *S.pyogenes* في إنتاج الستربتولايسين O عند التركيز 50 او100 ملغم/100مل فلم يحصل عنده أي إنتاج منها.

الجدول (4- 12) القدرة التثبيطية لأنواع المستخلصات النباتية في الأعداد الكلية وإنتاج الستربتولايسين O من عزلات بكتريا *Streptococcus.pyogenes*

أنواع المستخلصات المائية	التراكيز المستخدمة (ملغم /مل)	العزلة *S.pyogenes* 1 ❖		العزلة *S.pyogenes* 2	
		العدد الكلي و.ت.م/ مل	الستربتولايسين O (وحدة / مل)	العدد الكلي و.ت.م/ مل	الستربتولايسين O (وحدة / مل)
بذور الحبة السوداء	25	$3.6^{c} \times 10^{3}$	--	$1.4^{c} \times 10^{4}$	0.5^{b}
	50	$1.5^{e} \times 10^{3}$	--	$1.3^{e} \times 10^{2}$	--
	100	----	--	----	--
بذور الكلغان	25	$9.1^{a} \times 10^{5}$	0.7^{a}	$3.5^{b} \times 10^{5}$	0.9^{a}
	50	$3.0^{d} \times 10^{3}$	--	$1.9^{d} \times 10^{2}$	--
	100	----	--	----	--
أوراق الشاي الأخضر	25	$6.0^{b} \times 10^{5}$	0.8^{a}	$5.0^{a} \times 10^{6}$	1.0^{a}
	50	$3.1^{d} \times 10^{3}$	--	--	--
	100	----	--	----	--

a-e الاحرف المختلفة في العمود الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05

اتفقت النتائج مع ما جاء به AL-Timimy(2000) الذي وجد ان فعالية الحبة السوداء المضادة للأحياء المجهرية تسبب في تثبيط نمو البكتريا الموجبة و السالبة لصبغة كرام.ومع Tode (1989) الذي أكد ان مستخلص الشاي الاخضر ذو فعالية في تثبيط بكتريا *S.pyogenes* و *Salmonella sp* و*S.aureus*.وكذلك مع ما ذكره (Bisset ,1994) الذي وجد ان مستخلصات بذور الكلغان كانت ذا تأثير تثبيطي لبعض الانواع المايكروبية المرضية.ان التاثير التثبيطي لمستخلصات بذور الكلغان يمكن ان تكون بسبب احتواء هذه المستخلصات على المواد المانعة للأكسدة من المركبات Silymarin و Silibinin التي يكون فعلها في احداث ثقوب في الغشاء الخلوي للخلايا البكتيرية مسببة موت الخلايا من خلال اختلال توازن مكوناتها الداخلية (Bisset,1994).

ان التاثير التثبيطي لمستخلص الحبة السوداء يكون ناتجاً عن المركبات الفعالة الموجودة في تركيبها وهي الثايموكينون و السابوينينات و النيجليلامين والنيجللسين والسترولات التي يكون فعلها في تثبيط الخلايا المايكروبية من خلال اليات مختلفة باختلاف المركبات الفعالة المذكورة والتي تعمل جميعها في تثبيط او قتل هذه المايكروبات (Abdulwahid,2000).

وجد ان المركبات الفعالة في تركيب الشاي تمتلك هذه الخاصية التثبيطية من خلال مركب(EGCH (Epigallocatehin gallate في Catechin هو المركب الاكثر مسؤولية عن الفعالية المضادة للمايكروبات فيه (Toda, 1998 و Manning and Robert,2004) وكذلك اشار(Ikiag,1993) الى ان مادة Catechin الموجودة في الشاي الاخضر كانت قاتلة لانواع من البكتريا التي تسبب التسمم الغذائي التي منها*Clostridium spp, Staph aureus, S.pyogenes* وان فعله يكون من خلال تمزيق الغشاء الخلوي للخلايا البكتيرية.

4- 9 تحديد القدرة التثبيطية للنواتج الايضية من بكتريا حامض اللاكتيك والمستخلصات النباتية ضد عزلتي بكتريا *S.pyogenes*:

إن القدرة التثبيطية لنواتج الايضية من أنواع بكتريا حامض اللاكتيك من نوع *Lactobacillus acidophilus* و *Bifidobacterium bifidum* وتداخل النوعين مع بعضها عند التراكيز 10 و20 و 40 ملغم/مل على وسط مولرهنتون أكار ضد عزلتي بكتريا*S.pyogenes* 1و2 تحت ظروف تنمية تتمثل في pH 7.0 ودرجة حرارة 35ºم لمدة 24 ساعة، قد وضحها الجدول (4-13).

وضحت النتائج امتلاك النواتج الايضية لهذه الأنواع من بكتريا حامض اللاكتيك*Lb.acidophiles* و *B.bifidum* *وكليهما معاً* قدرة تثبيطية أكفأ معنويا (P<0.05) ضد عزلات بكتريا *S.pyogenes* عند إضافتها إلى الحفر عند التركيز 40 ملغم/مل مقارنة مع التراكيز 10و20 ملغم/مل من النوع البكتيري حيث أدى هذا التركيز 40 ملغم/مل الى تثبيط العزلة1 من بكتريا *S.pyogenes* بأقطار تثبيط 18.5 و 19.1 و 22.3 ملم للأنواع *Lb.acidophilus* و *B.bifidum* وكليهما معاً على التوالي.أما فعاليتها بنفس التركيز المذكور ضد العزلة 2 من *S.pyogenes* فقد كانت بأقطار تثبيط 16.4 و 17.2 و 20.5 ملم على التوالي.

أما عند التراكيز 20ملغم/مل من النواتج الايضية من الانواع *Lb.acidophilus* و *B.bifidum* و *Lb.acidophilus* مع *B.bifidum* فقد كانت أقطار التثبيط للعزلة1 هي 8.8.10.9.8.2 ملم على التوالي وكانت أقطار التثبيط للعزلة2 من الـ *S.pyogenes* هي 8.0 و 9.5 و 7.6 ملم على التواليولوحظ انه عند التركيز 10ملغم/مل كان الأقل فعالية تثبيطية ضد البكتريا المرضية *S.pyogenes* حيث كانت أقطار التثبيط للعزلة1 هي 4.3 و 4.7 و 4.0 ملم على التوالي للعزلة2 هي 3.8 و 4.1 و3.6 ملم للأنواع *Lb.acidophilus* و *B.bifidum* و*Lb.acidophilus* مع *B.bifidum* على التوالي.

اتفقت هذه النتائج مع ما ذكره كل من Nicolaides and Adams (1997) اللذان وجدا ان لبكتريا حامض اللاكتيك القدرة في إنتاج بيروكسيد الهيدروجين المثبط للانواع المايكروبية وكذلك مع Strom(2002) حيث أكد ان لهذه البكتريا فعالية تثبيطية بسبب قابليتها في انتاج المركبات الايضية من البكتريوسينات التي تؤدي إلى قتل الانواع البكتيرية المختلفة.

أظهرت النتائج ان للمستخلصات النباتية من بذور الحبة السوداء وبذور الكلغان واوراق الشاي الاخضر فاعلية تثبيطية معنوية عند ($P<0.05$) عند إضافتها في حفر وسط المولر هنتون أكار Muller Hinton agar ضد العزلتين 1و2 للنوع *S.pyogenes* وقد وجد ان التركيز 25 ملغم/100مل كان لها تأثيراً مثبطاً وكانت اقطار منطقة التثبيط التي ظهرت على الوسط هي 6.0 و 4.3 و 4.5 ملم على التوالي للعزلة 1 من الـ*S.pyogenes*.أما في حالة العزلة 2 فكانت أقطار مناطق التثبيط لنفس التركيز عند 6.5و 5.0 و 4.0 ملم على التوالي.وعندما ازداد التركيز ليصل الى 50 ملغم/ 100مل من المستخلصات النباتية أعلاه فقد كانت أقطار مناطق التثبيط هي عند 13.2 و 9.8 و 16.2 ملم على التوالي للعزلة 1 من بكتريا *S.pyogenes* وأما العزلة 2 فقد كانت 11.4 و 9.2 و 15.6 ملم على التوالي.لوحظ كذلك ان الفاعلية التثبيطية قد ازدادت مع زيادة التركيز الى 100ملغم/100 مل للمستخلصات حيث كانت أقطار مناطق التثبيط للعزلة 1 من 25.1 و 22.1 و 26.3 ملم على التوالي وكانت في العزلة 2 هي 24.7 و 21.6 و 25.4 ملم على التوالي.

اتفقت النتائج مع ما ذكره Bakir (2004) في تأثير مستخلصات الشاي على انواع البكتريا المرضية.وكذلك مع ما ذكره AL-Timimy (2000) الذي وجد ان مستخلصات بذور الحبة السوداء كانت ذا فاعلية في تثبيط الانواع المايكروبية، ومع Tode (1989) الذي وجد ان مستخلص الشاي الاخضر كان ذا فاعلية في تثبيط النوع *S.pyogenes*، ومع ما ذكره Bisset، (1994) الذي أكد ان مستخلصات بذور الكلغان كانت ذا فاعلية عالية في تثبيط النوع المايكروبي *S.pyogenes*.

ان فاعلية المستخلصات المائية من النباتات المذكورة في تثبيطها للنوع المايكروبي *S.pyogenes* يعود الى احتواء هذه المستخلصات على المركبات الفعالة التي يكون لها التاثير التثبيطي اذ ان وجود مركبات الثايموكينون والسابيوتينات والنيجيليلامين والنجليسين والسترولات في مستخلصات بذور الحبة السوداء يكون لها تاثير في تثبيط عمليات النقل للمغذيات في الخلايا البكتيرية، كما وجد مركبي Sylymarin و Silibinin في مستخلصات بذور الكلغان ومركب Catechin في مستخلصات الشاي الاخضر التي يكون فعلها في تمزيق الغشاء الخلوي البكتيري وبالتالي خروج المركبات من داخلها أو دخول مركبات لا تحتاجها الخلية مما يسبب بالتالي فقدان السيطرة على نظام النقل في الخلايا وموتها.

الجدول(4- 13) القدرة التثبيطية لأنواع المستخلصات المائية وبكتريا حامض اللاكتيك في عزلات *Streptococcus pyogenes*

أنواع المستخلصات المائية وبكتريا حامض اللاكتيك	التراكيز المستخدمة (ملغم /مل)	العزلة *S.pyogenes* 1	العزلة *S.pyogenes* 2
		قطر منطقة التثبيط (ملم)	قطر منطقة التثبيط (ملم)
Lb.acidophilus	10	4.3 k	3.8 i
	20	8.2 hl	8.0 h
	40	18.5 e	16.4 d
B.bifidum	10	4.7 k	4.1 i
	20	10.9 h	9.5 g
	40	19.1 e	17.2 d
Lb.acidophilus + *B.bifidum*	10	4.0 k	3.6 i
	20	8.8 hl	7.6 h
	40	22.3 d	20.5 c
بذور الحبة السوداء	25	6.0 i	6.5 l
	50	13.2 g	11.4 f

	100	25.1^{b}	24.7^{a}
بذور الكلفان	25	4.3^{k}	5.0^{i}
	50	9.8^{gh}	9.2^{g}
	100	22.0^{c}	21.6^{b}
أوراق الشاي الأخضر	25	4.5^{k}	4.0^{i}
	50	16.2^{f}	15.6^{e}
	100	26.3^{a}	25.4^{a}

a-k الاحرف المختلفة في العمود الواحد تعني وجود اختلافات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05.


الفصل الخامس
الاستنتاجات والتوصيات

5- الاستنتاجات والتوصيات

5- 1 الاستـنـتاجات:-

مما تقدم من نتائج الدراسة فانه يمكن استنتاج الحقائق العلمية التالية:-

1- كانت أفضل ظروف نمو وإنتاج الستربتولايسينO لبكتريا *S. pyogenes* هي عند حرارة 35 ^{O}م ورقم هيدروجيني 6.5 أو 7 وتركيز من FeO_3 عند 2.5 ملغم /مل من وسط التنمية.

2- لنوعي بكتريا حامض اللاكتيك *Lactobacillus acidophilus* ، *Bifidobacterium bifidum* فاعلية في تثبيط النمو وانتاج الستربتولايسينO من بكتريا *S. pyogens* ويكون التأثير الأكبر في حالة تآزرهما.

3- إن النواتج الايضية لنوعي بكتريا حامض اللاكتيك لهما نفس التأثير التثبيطي على بكتريا *S. pyogens* *وتزداد الفعالية التثبيطية* مع زيادة تركيزهما.

4- المستخلصات المائية لكل من بذور الحبة السوداء وبذور الكلغان واوراق الشاي الاخضر ذات فاعليه مرتفعة في تثبيط النمو وانتاج الهيمولايسين O من بكتريا *S.pyogenes* وقد ازدادت هذه الفعالية مع زيادة التركيز من المستخلصات المائية.

5- إن الفاعلية التثبيطية للنواتج الايضية من بكتريا حامض اللاكتيك كانت متوسطة بينما كانت المستخلصات النباتية مرتفعة نوعاً ما ضد بكتريا *S. pyogenes*

5- 2 التوصـيـات:-

اعتماداً على النتائج المتحصل عليها فإنه يمكن أن يوصى بالاتي :

1- عزل وتشخيص متأيضات بكتريا حامض اللاكتيك ودراسة تاثيراتها في معدلات النمو وضراوة انواع أحياء المجهرية مرضبة اخرى بصورة انفرادية او مشتركة

2- تنقية المواد الفعالة المكونة للمستخلصات النباتية بصورة منفردة ونقية ودراسة قدرتها التثبيطية ضد الأحياء المجهرية المرضية.

3- محاولة دراسة التأثيرات في 1و 2 أعلاه مع ظروف بيئية أو تركيبية من الوسط لأنواع بكتيرية مرضية اخرى.

المصادر

المصادر العربية:

– البناء، يلذر محمد علي أمين. (1998). تأثير الكافئين وبعض المستخلصات النباتية على بعض الفطريات والبكتريا المرضية والتفعيل اللانوعي للبلاعم، رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.

– التميمي، أريج عدنان يوسف. (2001). فعالية مستخلصات الحبة السوداء المحلية *Nigella sativa L*. ضد الإصابة المرضية ببكتريا *E. coli* في الفئران البيض، رسالة الماجستير، كلية التربية للبنات، جامعة بغداد.

– الزبيدي، زهير نجيب دبابان، هدى عبد الكريم و فليح، فارس كاظم (1996). دليل العلاج بالأعشاب الطبية العراقية. شركة آب للطباعة الفنية المحدودة، وزارة الصحة العامة، بغداد.

– الشماع، علي عبد الحسين. (1989). العقاقير وكيمياء النباتات الطبية، دار الكتب للطباعة والنشر، الموصل.

– العاني، اوس هلال جاسم. (1998). دراسة مكونات الحبة السوداء المحلية وتأثير مستخلصاتها على بعض الأحياء المجهرية، رسالة ماجستير، كلية العلوم، قسم علوم الحياة، الجامعة المستنصرية.

– عبد الجبار، مها. (2002). عزل وتنقية Streptolysin O من بكتريا *S. pyogenes* وإمكانية تحضير عدة مصلية للكشف عن المسبب البكتيري. رسالة ماجستير- كلية العلوم، قسم علوم الحياة، جامعة المستنصرية.

A

– Abdul, Wahid A. H. R. (2000). The hypoglycemic Effect of *Nigella sativa* L. Seed in None – Insulin Dependent Diabetic Patients. Diploma Thesis, Dept. Clinical Pharmacy. College of Pharmacy. University of Baghdad. 57-60.

– Abou, Zeid, N. A. and Mahmoud, W. H. (1993). Studies on the keeping quality of butter using *Nigella sativa* L. oil. Menofiy. J. Agric. Rec., V_1. N_4(2): 2403-2420.

– Abou-Basha, L. I.; Rashed, M. S. and Abou-Enein, H. Y. (1995). TL Assay of themoquinoein black seed oil *Nigalla sativa* L. and Identification of dithymoquinone and thymol. J. of Liquid Chromatography. 18(1): 106-116.

– Adams, M. R. and Nicolaides, N. (1997). Review of the sensitivity of different borne pathogens to fermentation. J. Food. Control, 8(5/6): 277-239.

– Adams, M. R. and Hall, C. J. (1988). Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acid and their Mixture. Int. J. food sci. Tech. 23: 287-292.

– Ahmed, S. and Ayoub, E. M. (1998). Severe, invasive Group A Streptococcal Disease and Toxic Shock. Pediatric Annals. 27(5): 287-292.

– Ahne, Y. J. S. Sakanaka, M. Kim, T. Kawamura, T., and Mitsuoka T. (1990). Effects of green tea extracts on growth of intestinal bacteria. Microb. *E. coli* Health Dis. 3: 335-338.

– Al Schuler L. (1998). Green Tea: Healing tonic. Am J. Natur Med. 5: 28-31.

– AL-Ani, A. H.; Alkaisey, M. T. and Sryaih, M. J. (2002). Determination of tochopherols and water Soluble Vitamin in

Seed Oil of Nigella Sativa L. by high performance liquid chromatography: PP. 18.

- Al-Haderet, A.; Aqel, M. and Hasan, Z. (1993). Hypoglycemic effects of the Volital oil of *Nigella sativa* L. Seeds. International. J. of pharm acognosy. 31(21): 96-100.

- Al-Jassir, M. S. (1992). Chemical composition and micro flora of black cumin *(Nigella sativa L.)* Seed growing in Saudia Arabia. Food Chemistry, 45(4): 239-242.

- AL-Kaisey, M. T.; AL-Ani, I. S. and AL-Dorri, S. K. (2002). Extraction and fatty acids characterization of black seed oil and its utilization in food processing in: "Proceedings of the Eight scientific conference of plyth echinic committee" Baghdad, Iraq, 30-31 March: 221-228.

- Alouf, J. and M. Raynaud. (1962)., Purification of Streptolysin O. Nature, (London), 196: 374.

- Alouf, J. E. and Raynaud (1984). Nouvel Method do Purification de La Streptolysin. O. C. R. Acad. Sci. Paris. 402-268.

- Altemier, W. A. (1998). Abreif History of Group. A Beta Hemolytic Streptococci. Pediatric Annals 27(5): 66-270.

- AL-Timimy, A. A. (2000). Efficiency of *Nigalla sativa* extracts against experimental infection with *E. coli* in white mice. M. Sc. Thesis, Coll. Edu. Baghdad Unive.

- Anesini, C. and Peres, C. (1993). Screeing of plant used in Aregentine Folk medicine for antimicrobial activity J.Ethnopagrm. 39: 119-128..

- Association of Official Analytical Chemists, AOAC. (2002). Official methods of analysis. 4th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Virginia. USA.

– Atlas, R. M. (1995). Principles of Microbiology. Mosby-year Book, Inc. Baltimore. pp: 119- 181.

– Attar, U., A.; Malik, S.; Ahmed, S.; Chaudhary, I. and Habib-Ur- R. (1985a). "Isolation and Structure determination of a new minor isoquino Line alkaloids nigellamine N. oxide From the Seeds of *Nigella sativa* L. "Heterocycles, 32(4): 953-955.

– Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In.; Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects, 2nd edition, Salminen, S. and Van Wright, A. PP. 1-72. Marcel Dekker Inc., New York.

– Azevedo, M. S; Mira, M. L and Manso, C. (1987). The neutralization of hydroxyl radical by Silibin, Sorbinil and bendazac. Free Radic Commun, 4: 125-29.

B

– Babayan, V. K.; Koottungal, D. and Halaby, G. A. (1978). Proximate analysis of Fatty and amino acids Composition *Nigella sativa L.* Seeds J. Food Sci. 43, 1314-1315.

– Bakir, L. K. (2004). Detection of *Heliobacter pylori* from Peptic ulcer Patients by histological and modified culture method and testing the Inhibitory effect of some plant extract. Doctorate thesis. Collage of Eduction. University of Basrah.

– Baron, E. J. and Fingold, S. E. (1994). Diagnostic Microbiology. 9th Ed. the C. V. Mosby Company. Baltimore. pp: 106-115.

– Baron, E. J. Chanj, R. S.; Howard, D. H.; Miller, J. M. and Turner, J. A. (1994). Medical Microbiology. A Short Course. John. Wiley and Sons, Inc. New York. pp: 135-147.

– Baron, S. and Jenning, P (1991). Medical; Microbiology. 3rd ed. Churchill Livingstone. New York, London, Edinburgh, Melbourne, Tokyo. 215-230.

– Baron, J. M.; Schepper, L. D. Domingue, G.; Huges, H.; Mattam, L. (1989). Friendly bacteria *Lactobacillus acidophilus* and Bifidobacterim. The Scientific Basis. pp: 210-224.

– Barry, A. L. (1979). The Antimicrobic Susceptibility Test: Principles and Practices. Lea and Febiger Philadelphia. USA.

– Bashandy, S. A. E. (1996). Effect of *Nigella Sative* oil on liver and kindeny function of adult and Senile rats. Egyption. J. of Pharmaceutical. Sci. 37: 313-327.

– Beachey, E. H.; Seyer, J. and Kang, A. H. (1980) Primary structure Antigens of type 24 streptococcal M protein. J.Biological Chemistry. 225(13): 6284-6289.

– Beard, C. W. (1980). Serological procedure. In: Isolation and Identification of avian pathogens. 2nd ed. Edited by Hitchner S. B.;C. H. Domer muth; H. G. Purchese and J. E. William. Ithaca New York. pp. 129-134.

– Beaulac, C.; Sachetelli, S. And Lagace, J. (1998). In Vitro bactericidal efficacy of Sub-MIC Concentrations of liposome – Encapsulated ant biotic against Gram negative and Gram Postive bacteria. Antimicrobial Agent and Chemotherapy. 41: 35-41.

– Belli, D. C., R. Auckenthaler, and P. E. Ferrir. (1984). Throat Cultures For Group A. B. Hemolytic Streptococcus. Importance of Anaerobic Incubation. Am. J. Dis. Child. 138: 274-276.

– Bernhiemer, A. W. (1972). Hemolysin of Streptococci: Characterization and effect on biological membranes. In: L. W. Wannamker and M. Masten (eds.). Streptococci and Streptococcal Disease Academic Press. New York and London. pp: 23-57.

– Bessen, D. and Fischetti, V. A. (1992). Pasive Aquired Mucosal Immunity to Group A Streptococci by Secretory Immunoglobulin A. J. Exp. Med. 167(6): 1945-1950.

– Biava, M.; Fiora vanti; R.; Porretta, G. C.; Franchey, G., Men Carelli, P.; Sleiter, G.; Perazzi, M. E.; Simonetti, N. and Villa A. (1995). Study of the methylation of N. aryl-mannich reaction: beta-amino methyl and N. azahetero ayl-Subsitued 2, 5 dipyrroles, Compounds with potential biological activity. Pharmacol. 50(6): 431-438.

– Bisset, N. G. (1994). Herbal drugs and Phyto pharma Ceticals. Boca Rotan, Fl. CRC. pp: 205-227.

– Boone, D. R.; Castenholz, R. W. and Garrity, G. M. (2001). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1, The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. 2nd. Ed., Springe-Verlag, New York, P. 165.

– Borriello, S. P.; Hammes W. P.; Holzapfel W.; Marteau P.; Schrezenmeir J.; Vaara M. and Valtonen V. (2003). Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. Clin. Infect. Dis. 36: 775-780.

– Bozoglu, T. F.; and B. Ray. (1996). Lactic acid bacteria: Current advance in metabolism, Genetic and application. Springier. Berlin. Germany.

– Briggs, M. (1953). The Classification of Lactobacilli means of Physiological tests. J. Gen. Microbiol., 9: 24-248.

– Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Morse, S. A. (1998). Jawetz, Melinick and Adelberg's. Medical Microbiology, 21st. ed. Middle East ed.; Appelton and lange Norwalk, San Mateo, California. USA.

C

- Campos, R.; Carrido, A.; Guerra, R. (1989). Silybin dihemisuccinate Protects against glutathione depletion and lipid Per oxidation included by acetaminophen and Vat liver. Plant med; 55: 417-90.

- Carducci, R.; Armellino, M. F.; Volpe, C.; Basile, G.; Gaso, N.; and Basile, V. (1996). Silibinin and a cut Poisoning with Amantia Phalloides. Minerva Anestesiol ; 62(5): 187-93.

- Chakravarty, H. L. (Ed.) (1976). In: [Plant Wealth of Iraq] Vol. 1, Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Iraq, Baghdad, PP. 387.

- Chakravarty, N. (1993). Inhibition of histamine release From mast Cell by Nigellone-Ann-Allergy. 70(3): 237-242.

- Chambers, H. F. (1994). Infectious Disease: Bacterial and Chlamydial. In: L. M. Tierney, S. J. Mcphee and M. A. Papudakis (eds.) Current Medical Diagnosis and Treatment. Lange Medical Book, Appleton.

- Cheikh, Y. A.; Pogori, N.; Chen, H.; Tia, F.; Chen, W.; Tag, J. and Zhang, H. (2008). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bifidobactwerium ifantics*. J. F. Food Cont. 20 (6): 553-559.

- Chemical Source International (2000). All Chemical Suplliers For: Epigallo Catechin Gallate [http: //Kw/innova. net/chemSourcesl]

- Chosa, H. Toda, M. Okubo, S. Hara, Y. & Shim amura, T. (1992). Antimicrobial and Microbicidal activities of tea and Catechins against Mycoplama. Kansen Shogaku Zasshi, 66(5), 606-611.

– Chumchalova J.; Stiles J.; Josephsen J.; and Plockova' M. (2004). Characterization and purification of acidocin CH5, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* CH5. J. Appl. Microbiol. 96: 1082-1089.

– Collee, J. G.; Duguid, J. P.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P. and Simons. A. (1996). Laboratory Strategy in the Diagnosis of Infective Syndrome. pp: 410-435.

– Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiol. Rev., 46: 269–280.

– Conte, M. P.; Schippa S.; Zamboni, L.; Penta, M.; Chiarini, F.; Seganti, L. Osborn, J.; Falconieri, P. (2006). Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patient with inflammatory bowel disease. BMJ Journals. 55 (12): 1760-7.

– Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. (2005). Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. Appl. Environ. Microbiol. 71: 3060-3067.

– Cotter, P. D. and Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. MMPR. 67(3): 429-453.

– Cowan, S. T. (1985). Manual For the Identification of Medical Bacteriology, (2nd ed.), Cambridge University Press. London. pp: 113-127.

D

– Davis, B. D., Dulbecco, R.; Eesen, H. N. and Ginsberg. H. S. (1990). Microbiology. In Culding Immunology and Molecular. Genitics. 14th ed. G. B. Libbinott Company. pp: 613-701.

– Davis, B. D.; Dulbecco, R.; Eisen, H. and Ginsberg. H. (1980). Microbiology. Harper International edation. 56-110.

– Deliving, A. A.; Kehoe, M. A. and Robinson, J. H. (1997). Phagocytic Processing of two M. Protein T-Cell Epitopes from Viable Group A streptococci. 660th Meeting, Joint Congress with the British Society for Immunology, Harrogate. pp: 1013-1027.

– Demellawy, M.; El-Ridi, R.; Guirguis, N. I.; Abdet Alim, M. Kotby, A.; Kotb, M. (1997). Perferenatial Recognition of Human Myocardial Antigenes by T Lymphocyte from Rheumatic Heart Disease Patients. Infect. Immun. 65 (6): 2197-2205.

– Desmazeaud, M. (1996). Lactic acid bacteria in Food: use safety. J. Chariers Agricultures 5(5): 331-342.

– Donohue, D. C.; Salminen, S. and Marteau, P. (1998). Safety of probiotics bacteria, in acetic acids bacteria eds. salminen, S. Von wright. New York. Marcel Dekker.; (5): 369-383.

– Drasar, B. S.; and Hill, M. J. (1974). Human Intestinal Flora. Academic Press. New York. 120-159.

– Draser, B. S.; and P. A. Barrow. (1985). Intestinal microbiology Am. Soc. microbiology. Washington D. C., USA.

E

– El-Alfy, T. S.; El Fatatry, H. and Toama, M. A. (1975). Isolation and structure assignment of antimicrobial Principles From the Volatile oil of *Nigella sativa L.* Seeds. Pharmazie. 30: 109-111.

– EL-Faham and Sawsan. Y. (1994). Comparative Studies on Chemical Compostion of *Nigella sativa L.* Seeds and its Cake. J. Agricsci. Man Soura. Univ. 19(7): 2283-2289.

– El-Ghamry, A. A. (1998). Feeding Values of Black Cumin (*Nigella sativa L.*) meal and Sweet lupin Seeds For laying hens. Man Soura. Univ. J. of-Agric. Sci. (Egypt).

– Evans, W. (2002). Trease and Evans Pharmcognosy. 15th ed., WB Saunders Co. Ltd., PP: 478.

G

– Geissman, T. A. (1962). Chemistry of Flavonoids Compounds. Macmillan Co., New York. PP: 805-813.

– Gillilanb, S. E. (1985). Bacterial starter culture for foods. CRS press. Inc. Boca Raton Florida. USA.

– Gomes, A. M. P.; Malcata, F. X. and Klaver, F. A. M. (1998). Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. J. Dairy Sci. 81: 2817-2825.

– Graham H. N. (1992). Green tea composition, and Poly Phenol Chemistry Prevmed, 21: 334-350.

– Gupta, R.; Talwar, G. P. and Gupta, S. K. (1992). Rapid Antibody Capture Assay For Detection of Group A Streptococci Using Monoclonal Antibody and Colloidal Gold-Monosepecific Polyvalent Antibody Conjugate. J Immunol. 13(3): 441-455.

H

– Hadadji, M.;Benamay R.; Saidi, V; Heni, D. and Kihal, M. (2005). Identification of Cultivable *Bifidobacterium sp.* Isolated from breast-feel infants in west_Algeria. African Journal of Biotechnology. 4: 422-430.

– Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. (1990) The antioxidant of human extra cellular fluids. Arch Bio Chem. Bio Phys.; 280: 1-8.

– Hamilton-Miller, J. M. T. (1995). Antimicrobial Properties of tea (*Camellia sinensis*. L) Antimicrobial Agent and chemotherapy 39, 2375-7.

– Hammes, W. P. and Vogel, R. F (1995). The geneus *Lactobacillus* in: The Genera of Lactic Acid Bacteria ed. PP: 905-929.

– Hara, Y., and T. I shigami (1989). Antibacterial activities of tea Poly Phenols against Food borne Pathogenic bacteria. Tpn. Soc. Food Sci. Technol. 36: 996-999.

– Harbone, J. B. (1984). Phytochemical methods Aguide to modern techniques of plant analysis. 2nd. ed. Champman and Hall, London, New York. PP: 1013-1039.

– Harmsen. K. J. M.; Wildehoer, A. C. M.; Raangs, G. C.; Wagendorp, A. A.; Klijn, N.; Bindels, J. G.; Welling, G. W. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 30: 61-67.

– Harrigan, W. F. and Ms Cance, M. E. (1976). Laboratory Methods in Food and Deity Microbiology. Academic Press. London. PP: 502-516.

– Hasan, C. M.; Ahasan, M. and Islam, S. N. (1989). *In vitro* antibacterial screeing of the oils of *Nigella sativa* seeds. Bangladesh. J. Bot. 18(2): 171-174.

– Hikino, H.; Kiso, Y.; Wagner, H. and Fiebig M. (1984). Antihepatotoxic actions of flavonolignans from *Silybum marianum* fruits. Plant a Medical. 50: 248-50.

– Hill, M. J. (2002). Factors controlling the microflora of the healthy upper gastointestinal tract, pp. 57-85. In M. J. Hill and P. D. Marsh (ed.), Human microbial ecology. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

– Hobbs, C. 1994. Milk thistle: The liver herb. Loveland (Co): inter weave press;. pp: 95-103.

– Hodgsson J., Puddey I. Burke V., Beillin L. (1999) Effects on blood Pressure of drinking green and black tea. J. Hypertension 17: 457-463,.

– Hollman, P. C. H. Feskens, E. J. M & Katan, M. B. (1999) Tea Flavonols in Cardiovasular disease Canser epidemiology. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 220, 198-202.

– Holt, H. G.; Krieg, N. R.; Sheath, P. A.; Statey, T. T. and Williams. S. T. (2005). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 4th ed. Williams and Wilkins. Baltimore. pp: 260-271.

– Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sheath, P. H. A.; Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. William and Wilkins, Baltimore. pp: 157-163.

– Hookey, J. V.; Saunders, N. A.; Clewely, J. P.; Efstration, A and George R. C. (1996). Virulence region Polymorphism in group A Streptococci for Epidemiogical and Evolutionary Studies. J. Med. Microbiol. 45: 285-293.

– Hosegawa, H. Matsumya S. and yamaski, K. (1998). Revesal of efflux mediated Tetra Cycline resistance in *Staphylococcus aureus* Clinical isolate. J. Phyto. Res. 9(4): 260-263.

– Hudson, L. and Hay, F. C. (1980). Prectical Immundogy. 2th ed. Blackwell. Scicnt. Public. pp: 118-120.

I

– Iglewski, W. J. and Gerhardt. N. B. (1978). Identification of an antibiotic producing bacterium from human intestinal tract and characterization of it's anti microbial product. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 13 (1): 81 89.

- Ikigai, H. T. Nakae, Y. H, and. Shimamura. T. (1993). Bactericidal Catechins damage the lipid bilayer. Biochim. Bio phys. Acta. 1147: 132-13.

J

- Jaffer, H. J.; Mahmoud, M. J.; Jawad, A. M.; Naji, A and AL-Naib, A. (1983). Phytochemical and Fitoterapia. LIX, 229. pp: 182-193.

- Jaggi, N. (2005). Microbiology Theory for MLT. Medical publishers (p Ltd. New Delhi, India).

- Jawetz, E.; Melnick, J. L. And Adelberg. E. A. (1998). Medical Microbiology (2th ed.) Librarie duliban, Beirut. pp: 225-239.

- Jawetz, E.; Melnick, J. L. And Alderery. E. A. (1984). Review of Medical Microbiology (16^{th} ed.) Librarie duliban, Beirut. pp: 311-327.

- Joerger, R. D. (2003). Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. Poultry Scince; 82 (4): 640-647.

- Johnson, D. R.; Kaplan E. L.; Sramek, J.; Bicova, R.; Harlicek J., motlova, J. and Kriz, P. (1996). Laboratory Diagnosis of Group A Streptococcal Infection. world Health Organization, Geneva. pp: 85-97.

- Joklik, W. K.; Willett, H. P., Amos, D. B and Wilfert, Hall C. M. (1992). Zinsser Microbiology, 20^{th} ed. Prence. Hall International Inc. U. S. A. pp: 11-39.

K

- Kamezawa, Y. Nakahara, T.; Nakano, S.; Abe Y.; Nozokirenard, J. and Isono, T. (1997). Streptococcal Mitogenic Exotoxin Z, Anoval Acidic Super antigenic Toxin Produced by T. Strain of *Streptococcus pyogenes* Infect. Immuni. 65(9): 3828-3833.

- Kandler, O. and Weiss, N. (1986). Genus. *Lactobacillus* In: Bergeys manual of Systematic Bacteriology. (Sneah, P. H. A.; Mair, N. S and Hol, J. G. ed). Vol. 2 Will kins Co. Baltimore. M. D. U. S. A.. pp: 999-1031.

- Kaplan, E. L. (1992). The Carditis Cardiomyo path of Rheumatic Fever: Relation Ship to Pathogenesis. Postgrad Med. J. 68 Suppl. 1: 521-523.

- Katiyar S K., and Mukhtar H. (1997). Tea antioxidants in cance prevention. J. Cell Bio Chem. (Supp1); 27: 59.

- Kaur, I. P.; Chopra, K. and Saini. A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. Eur. J. Pharm. Sci. 15: 1-9.

- Khaled Alsaeid F. A. P. and Majeed, H. A. (1998). Acute Rheumatic Fever. Diagnosis and Tertment. Pediatric. Ann. 27(5): 295-300.

- Klaenhammer, T. R. (2000). Probiotic bacteria: today and tomorrow. Journal of nutrition. 130: 4155-4165.

- Korchagina, L. K. and Rudyk, V. F. (1979). Influence of fatty and bile acids and thiol reagentson the activity of lipase of *Nigella sativa* L. Seeds. Applied Biochemistry and Microbiology. 15(1): 87-90.

- Krugman, S.; Katz, S. L.; Gershon, A. A. and wilfert, M. (1985). Infectious Disease of children. 8^{th} ed. The C. V Mosby Company. 269-387.

L

- Ladas, E. J. and Kelly, K. M. (2003). Milk thistle: is there a role for its use as an Adjunct therapy in Patient with Cancer. Alternative and Complementary medicine; (3): 411-16.

- Ladd, J. T.; Jacobson, M. and Buriff, C. (1978). Japanese beetles: extracts From neem tree seeds as Feeding deterents. J. Econ. Entomol. (71): 810-813.

- Lee. C. K. (1998). Screeing and Isolation of Antibiotic resistance inhibitors from herb materials resistance inhibition of Volatile Components of koream aromatic herbs. J. Pharm. Res., 21(1): 62-66.

- Lee, Y. K. and Salminen, A. (2009). Probiotic and Prebiotic. Handbook, 2ed ed., John Wileu, and Sons, Inc. pp: 23-29.

- Liévin, V.; Pieffer, I. Hubauld, S. Rochat, F. Brassart, D. Neeser J. R. and Servin, A. L. (2000). Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. Gut. 47: 646-652.

- Lievin-L. M. V.; Servin, A. L. (2006). The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota. Clin. Microbiol Rev. 19: 315-337.

- Ljungh, A. and Wadstrom, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. Curr Issues Intest. Microbio. 7: 73-89.

M

– Mack, D. R. and Lebel, S. (2003). Role of Probiotic in the modulation of intestinal infection and inflammation Curr. Opin. Gastroenterol. 20: 22-26.

– Mahfouz, M. and El-Dakhakhny, M. (1966). The Isolation of a crystalin active principle from *Nigella sativa* Seeds. J. Pharm. Sci. (1): 9-19.

– Mahon, C. R. and Manuselis, G. J. (1995). Text book of Diagnostic Microbiology. W. B. Saunders Company. Philadelphia. London. Toronto. Montreal. Sydney. Tokyo. pp: 63-83.

– Mahowald M. A.; Rey F. E.; Seedorf. H.; Turnbaugh, P. J.; Fulton, R. S.; Wollam, A.; Shah, N.; Wang, C.; Magrini, V.; Wilson, R. K. (2009). Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.

– Mandell. G. L.; Bennett, J. E. and Dolin, R. (1995). Mandell Douglas and Bennetts Principles and Practice of In Fectious Disease. 4th ed. Vol. 2. Churchill Livingstone. New York. Edinburgh. London. Melbourne. Jokyo. PP: 157-163.

– Manning, J., Rebort, J. C. (2004). Analysis of Catechin Content of Commercial green tea Products. Journal of herbal Pharm Cotherpy. 3: 19-32.

– Marteau, P. R.; De Vrese, M. and Schrezenmier, C. J. (2001). Protection from gastrointestinal disease with the use of probiotics. Am. J. Clin. Nutr. 73: 430-436.

– Martin, R.; Jimenez, E.; Heilig, H.; Fernandez, L.; Marin, M. L.; Zoetendal, E. G.; Rodriguez, J. M. (2009). "Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel

electrophoresis and quantitative real-time PCR". Appl. Environ. Microbiol. 75: 965-9.

– Meile, L.; Ludwig, W.; Rueger, U. Gut, C.; Kaufmann, P.; Dasen, G.; Wenger, S. and Teuber, M. (1997). *Bifidobacterium lactis* sp. a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. Syst. Appl. Microbial. 20: 57-64.

– Messaoudi, D. F.; Berger, C. N.; Coconnier, M. H.; Moal, L. and Servin, A. L. (2005). PH-Lactic acid and non-lactic acid depentdent activities of probiotic Lactobacilli against *Salmonella enteric* Serover *typhmurium*. J. AEM. 71: 6008-6013.

– Mishra, C. and Lambert, J. (1996). Production of antimicrobial substances by probiotics. Asia Pascific. J. Clin. Nutr. 5: 20-24.

– Montville, T. J. and Kaiser, A. L. (1993). Antimicrobial proteins: Classification, Nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins in: Hoover, D. G. and Stecnson, L. R. (editiors). Bacteriocins of Lactic acid Bacteria. Academic press. New York. P. 1-22.

– Mora M, Bensi G., Capo S., et al. (2005). "Group A streptococcus produce pilus – like structure containing protective antigens and Lance field Tantigen ". Pors Natl Acad Sci USA 102(43): 1541-1546.

– Moses, A. E.; Zir, A. And Harari, M. (1995). Increased incidence and Severity of *Streptococcus pyogenes* bactermia in young children Pediatr. Infect. Dis. J. 14: 767-770.

– Mouni, F.; Aissi, E.; Hernandez, J.; Gorocica, P.; Bouquelet, S.; lenteno, E.; Lascurain, R.; Garfias, Y. (2009). Effect of *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 cytoplasmic traction on human immune cells. Immunological Investigations. 38: 104-115.

– Muhsen R. K. (2007). The Use of *Lactobacillus acidophilus* as a Probiotic in the Prevention and Treatment of a bacterial cause of enteritis in dogs. Ph. D. th., College of Veterinary Medicine Baghdid University.

– Muzes, G.; Deak, G. and Lang, I. (1991). Effect of bioflavonoid Silymarin on the in Vitro activity and expression of super oxide dismutase (SOD) enzyme. Acta. Physiol. Hung; 78: 3-9.

– Myrvik, Q. N. and weiser, R. S. (1988). Fundamentals of Medical Bacteriology and Mycology. 2nd ed. Lea and Febiger. pp: 88-116.

N

– Nakachi, K., Mastsunyama S., Miyke S., Suganuma, M. Imai K. (2000). pereventive effects of drinking green tea on Canser and Cardiovasular disease: epidemiological evidence for multiple targeting Prevention. Bio Facter 13: 49-54.

– Naser, S. M.; Dawyndt, P.; Hoste, B.; Gevers, D.; Vandemeulebroecke, K.; Cleenwerck, I.; Vancanneyt, M.; Swings, J. (2007). Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses. Int J. Syst. Evol Microbiol. 57: 2777-2789.

– National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCls). (1993) Performance Standard for antibiotic Susceptibility testing NCCls. Villanova P. A. pp: 309-333.

O

– Olmez, U. : Turgay, M.; Ozenirler, S.; Tutkak, H.; Duzgun, N.; Duman, M. and Tokgoz, G. (1993). Association of HLA Class I and Class II antigens with Rheumatic Fever in a Turkish Population. Scand. J. Rheumatol. 22(2): 49-52.

P

- Paco, R. S.; Leme, I. L.; Battino, J. A. and Ferreira, A. J. P. (2003). Identification of *Lactobcillus spp* from broiler litter in Brazil. Braz. J. Microbiol; 34(3): 320 – 324.

- Park, S. H.; Itoh, K.; Fujisama, T. (2003)Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM5804T. J. Apple. Microbiol. 95(2): 294-300.

- Parker, M. T. (1984). Principle of Bacteriology, Virology and Immunity, 7th ed., Vol. 11, Eda ward Arnold Publish, London.

- Paul, W. E. (1999). Fundamental Immunology. 4th ed. Lippincott-Raven. Philadelphia. New York. PP: 99-113.

- Perez, C.; Pauli, M. and Bazergue, P. (1990). Antibiotic assay by the agar well diffusion method. J. Acta. Biologic. Acta medicine experimenalis., 15: 115 -119.

- Peter, G. (1997). Red book Report of the Committee on Infectious Disease, 24th ed., American Academy of Pediatrics. PP: 57-73.

- Piard, J. C.; Kuipers, O. P.; Rollema, H. S.; Desmazeaud, M. J. and Devos, W. M. (1993). Structure organization and expression of let gene for lacticin 481, A novel antibiotic produced by *lactococcus lactis.* J. Biol. Chem. 268: 16361-16368.

- Pichichero, M. E. (1995). Group A Streptococcal Ton sillo pharyngitis Cost Effective Diaganosis and Tretment. Ann. Emerg. Med. 25(3): 404-406.

- Post-White, J.; Ladas, E. J. and Kelly, K. M. (2007). Advances in the use of Milk thistle (Silybum marianum). Intergrative Cancer Threrapies. 6(2): 104-109.

- Prescott, M.; John, P. and Donald, A. (2005). Microbiology. 6th ed. USA.

R

– Randhawa, M. A. and Al-Ghamdi, M. S. (2002). A Review of the Pharm a Cotherapeutic effect of *Nigella sativa*. Pakistan. J. Med. Res., 41(2). 116-122.

– Rasheed, A., Haider M. (1998). Antibacterial activity of *Camellia sinensis* extracts against dentel Caries. Archpharm Res. 21: 348-352.

– Richinger, K. H. (1992) Flora of liver and gastroIntestinal disease seen in Cholestasis of Pregnancy. Gastroert Clin. Nam; 21: 905-921..

– Roddey, O. F. H. W. Clegg, L. T. Clardy, E. S.; Martin, and R. L. Sweten burg. (1986). Comparison of A Latex Agglutination Test and Four Culture Methods for identification of Group A Streptococci in Pediatric office Laboratory. J. Pediater. 108: 347-351.

– Rofle, R. D. (1991). Population dynamics of the intestinal tract In: Blackenship, L. C. (Editor). Control of Human Bacterial Enteropathogenenes in poultry. Academic press. Inc. San Diego, USA. P: 59-75.

– Ross, P. W. (1995). Streptococcus and Enterococcus. In: J. G. Collee. A. G. Fraser and B. P. Marmson (eds.) Practical Medical. PP: 33-73.

– Rotta, J. (1986). Pyogenic Hymolytic Streptococci. In: P. A. Sheath, N. S. Mair, M. E. Sharp and J. G., Holt (eds.) Bergys Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins, USA. PP: 117-123.

S

– Sad Zuka, Y.; Sugiyama, T.; Sonobe, T. (2000). Efficacies of tea components on doxorubicin induced antitumer activity and reversal of muiti drug resistance. Toxicology Lett. 133: 155-162.

– Saito T. (2004). Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. J. Anim. Sci. 75: 1-13.

– Sakanka, S. Mokim, M. Taniguchi, and T. Yamamoto. (1989). Antibacterial Substance in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, acariogenic bacterium. Agric. Biol. Chem. 53: 2307-2311.

– Sanders, M. E. and Klaenhammer, T. R. (2001). Invited review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. J. Dairy Sci. 84: 319-331.

– Santacruz, A.; Marcos, A.; Wamberg, J.; Marti, A.; Martin-Matillas, M.; Campoy, C.; Moreno, L. A.; Veiga, O.; Redondo-Figuero, C.; Garagorri, J. M.; Azcona, C.; Delgado, M.; GarciaFuentes, M.; Collado, M. C.; Sanz, Y. (2009). Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. Obesity. 2: 102-112.

– Scarovi V. (1986). The genus Bifidobacterium. Page 1418 in Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2ed. Sneath, P. H. A.; Nasser, N. S. and Holt, J. K. 1418-1434.

– Schell, M. A, Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M. C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R. D., Arigoni, F (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 99. pp. 14422-14427.

- Schmidt, K. H.; Gunther, E. and Courteny, H. S. (1996). Expression of both M. Protein and Hyaluronic Acid Capsule by Group A Streptococcal Strain Result in a high Virulence for Chicken Embryos, Med. Microbiol. Immunol. 184: 169-173.

- Schulz, V.; Hansel, R. and Tyler, V. E. (1998). Rational Phytotherapy: Aehysician's guid to herbal medicine. 3ed Berlin: Springer – Verlag. pp: 813-835.

- Servin A. L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiology Reviews. Article in press.

- Sgorbati, B.; B. Biavati, and D. Palenzona. (1995). the genus Bifidobacterium, p. 279-306. In: B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (ed.), the lactic acid bacteria. Volume 2. The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, London.

- Shah, N. P. (2001). Functional Foods from Proboitics and Preboitics. Food Technology. 55 (11): 46-53.

- Shanson, D. C. (1982). Microbiology in Clinical Practice, 1st, Wrichi. PSG. Bristol, London, Boston. pp: 33-40.

- Sharp, N. E.; Fryer, T. F. and Smith, D. G. (1973). Identification of lactic acid bacteria. In: Skinner, F. A. (editor). Identification Methods for Microbiologest. Academif press. London.

- Sharquie, K. E., Al-Turfi, I. A. and Al-Salloum. S. M. (2001). The antibacterial activity of tea *inVitro* and *inVivo* (inpatients with Impetigo Contagiosa). J. DERM. 27 (H): 706-710.

- Smith, A. H.; Imlay, James A. and Mackie, R. I. (2003). Increasing the oxidative Stress Respone Allows *Esherichia coli.* to over come Inhibitory effects of Condensed Tannis. Applied and Enviorn mental Microbiology. Vol. 69, (6) 3406-3911.

- Smulders, F.; Barendsen, P.; Logting, J. and Marel G. (1986). Lactic acid consideration in Favor of its acceptance as meat decontamination. J. Food Tech. 21: 419 – 436.

- Sneath, P. H. A.; Mair, N. S.; Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (1994). Bergey's Manual of systemic Bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimoe vol. 2.

- Stahl, E. (1969). Thin layer chromatography. Alaboratory hand book. 2nd ed. translated by Ash Worth, M. R. F. Springer – Verlag. Berlin. pp: 63-72.

- Starr, M. P.; Stolp, H.; Truper, H. G.; Balows, A. and Schlegel, H. G. (1981). The Prokaryotes – Hand book on Habitates, Isolation and Identification of Bacteria. Vol. 2: 1573-1589.

- Stensvold, T., Tverdal, A., Solvoll, K. (1992). Tea Consmption, relationship to Cholestrol, blood Pressure and Coronary artery disease mortality. Prev. Med. 21: 546-553.

- Strom, K. Sjogren, J.; Broberg, A. and Schnuyrer, J. (2002). *Lactobacillus Plantraum* Mill AB 393. Produces the antifungal cyclic dipeptides (Phepro) and Cyclo (phe-trans – 4 – oh – pro) and Phenyl lactic acid. Appl. and environ. Microbiol., 68: 4322-4327.

- Sung H. Nah J., Chun S. Park H., yang S., Min W., (2000) *In vivo* antioxidant effect of green tea. Eur. J. Clin. Nutr. 54: 527-529.

T

- Tagg, J. R. and Vugler, L. G. (1986). Enhacement of the Hemolysis Activity of group B Streptococci and Streptolysins Deficient Group. pp: 266-313.

- Talaro, K. and Talaro A. (1996). Foundation in Microbiology, (2nd ed.), Time Mirror Company, USA. pp: 333-353.

- Tang, B., Banerjee, B.; Green berger, P. A.; Fink, J. N. and Kump, V. P. (2006). Antibody binding of *Aspergillus fumigatus* a Cllergen. Bio chem., Biophys, res. Commun. Apr., 270(3): 1128-35.

- Tejada-Siomon, M. V.; Lee, J. H.; Ustunol, Z. and Pestka, J. J. (1999). Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* responses to Cholera toxin in mice. J. Dairy Sci. 82: 649-660.

- Tissier, H. (l906). Treatment des infections intestanales par la method de flora bacteriocin de l intestin. CR - Soc. BIOL. 60: 359- 361. (English Summary)

- Tissier, M. H. (1900). Recherches sur la norc intestinale normale et pathologique du nourisson. Thesis. University of Paris, Paris, France. In Kawasaki, S.; Nagasaku, M.; Mimura, T.; Katashima, H. and et al. (2007). Effect of on colony development by Bifidobacterium species. Applied and Enviromental Microbiology. 73 (23): 7796-7798.

- Tnakur, A. and Prakash, K. (1996). Detection of Antibody to C-Carbohydrate of Group A Streptococci with Enzyme-Treated whole bacterial cells as Antigen for ELISA. J. Med. Microbiol. 45: 214-218.

- Todaro. F.; Germano. D. and Griseo, G. (1996). An out breaks of tinea pedis and tinea cruris in a tyre factory in Messina, Italy, Mycopath. 84(1): 25-7.

- Tode M., S., Okubo, R. Hiyoshi, and T. Shimaura. (1989). The bactericidal activity of tea and coffee. Lett. App1. microbiol. 8: 123-125.

- Toppo zada, H. H; Mazloum, H. A and Dakhakhny, M. E. L. (1965). The antibacterial of *Nigella sativa* seeds Active Principle with some Clinical applications J. Med. Ass. 48: 187-202.

– Tuber, M. (1995). The Genus Lactococcus, In: The genera of Lactic Acid Bacteria. Edited by (Wood, B. J. B, and Holzapfel, W. H.). Blackie A and P. pp: 783-799.

U

– Ustun, G.; Kent, L.; Ceken, N. and Civelekoglu, H. (1990). Investigation of Technological Properties of *Nigella sativa L.* (black Cumin) seed oli. J. A. O. C. S. 67, 158-160.

V

– Vankni, Y. Hadas, R.; Schaffer man, D.; Murkhovsky, L. and Bashan, N. (2008). The Potential of Milk thistle (Silybum marianum L.), an Israeli native, as a Source of edible sprouts richin antioxidant. Inter J Food Sci. and Nutri. 4: 339-346.

– Vescovo, M.; Torriani, S.; orsi, C.; Macchiarolo, F. and Scolari, G. (1996). Application of antimicrobial – Producing lactic acid bacteria to Control Pathogenes in ready to use vegetables. J. of Applied Bacteriology, 81: 113-119.

– Vuyst, L. D. and E. J. Vandamme. (1994). Bacteriocin of Lactic acid Bacteria Microbiology. Genetic and Application. 1st Bacteria. Academic and Professional. UK. (Cited by Mousheli, 2001).

W

– Wagner, H.; Diesel, P. and Seitz, M. (1974)The Chemistry and analysis of Silymarin from Silybum marianum Gearten. Arzneitimttel. for Schung.; 24: 466-71.

– Wagner, H.; Horhammer, L. and Muster, R. (1968). The Chemistry of Silymarin (Silybin), the active Principle of the fruite of Silybum marianum (L.) Gaertn. Arzneim-Forsch Drug Res. 18: 688-96.

– Weerkamp, A. H., I. Bovee-Oudenhoven, and R. van der Meer. (1996). Effect of probiotics on infections with pathogenic bacteria in human gut flora-associated rats. Page 36 in Proc. Fifth Symp. On Lactic Acid Bacteria-Genetics, Metabolism, and Applications, Caben, France.

– World Health Organization WHO(2002). Guality Control methods for medicinal Plant material. Regional office For the western Pacific – Manila. pp: 3-27.

Z

– Zeitoun, M. A. M. and Neff, W. E. (1995). Fatty acid, triacylgly cerol, to Copherol, Sterol, Phospholipids Composition and Oxidative Stability of Egyptian Nigella Sativa L. seed oil. Oligineux corps Gras Lipids France. 2, 242-248.

– Zhio, W.; Hu, Z.; Okub, S.; Hara, Y. and Shimaurra, T. (2002). Inhibition of Penicillinase by epigallo catechin gallate resulting in restoration of antibacterial activity of Pencillin against Penicillinase – Producing *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 2266-2268.

الملخص

أجريت الدراسة في مختبرات قسم علوم الحياة في كلية التربية للفترة من 2009/7/1 لغاية 2010/5/1 التي تضمنت عزل وتشخيص عزلتين لبكتريا *Streptococcus pyogenes* وبيان مدى تأثير بعض العوامل في قابلية النمو وإنتاج إنزيم الستربتولايسن O ، وكذلك عزل وتشخيص عزلات لكلاً من *Lactobacillus acidophilus* ، *Bifidobacterium bifidum* فضلاً عن الاستخلاص المائي لكل من بذور الحبة السوداء والكلغان وأوراق الشاي الاخضر، وبيان تأثير التداخل بين نوعي بكتريا حامض اللاكتيك والمستخلصات النباتية على نمو عزلتي بكتريا *S. pyogenes* في إنتاج الستربتولايسن O من جهة أخرى.

بينت نتائج التشخيص ان عزلتين من البكتريا التي تم عزلها من المصابين بالتهاب البلعوم Pharyngitis بعد إجراء الفحوصات المظهرية والمزرعية والبايوكيميائية تعود الى النوع *S. pyogenes*. كذلك تم تشخيص النوعين *Lb. acidophilus* و *B. bifidum* من منتوجات الألبان اعتماداً على الصفات التي أشير إليها، فضلاً عن التشخيص للمركبات الفعالة في المستخلص المائي لكل من بذور الحبة السوداء وبذور الكلغان وأوراق الشاي الاخضر التي تبين احتواءها على كل من الراتيجينات، الصابونيات، القلويدات، التانينات، الكلايكوسيدات، الفينولات، الفلافونات والكومارين في بذور الكلغان ولم تحتوي كل من بذور الحبة السوداء واوراق الشاي الاخضر على كل من القلويدات والتانينات في كل منهما.

بينت النتائج أيضاً ان الظروف المثالية لتنمية عزلتي بكتريا *S. pyogenes* وإنتاج الستربتولايسن O منها كانت عند 35^0 م حيث وصلت أعدادها 4.3×10^8 و.ت.م/ مل و1.5 وحدة /مل من الهيمولايسين على التوالي للعزلة1 و 2.9×10^8 و.ت.م. /مل و 1.1 وحدة/ مل من الستربتولايسن O على التوالي وعند رقم هيدروجيني 6.5 و 7.5 وعند تركيز 2.5 ملغم من Fe_2O_3 / مل من الوسط الزرعي.

اما تأثير التداخل بين كل من نوعي بكتريا حامض اللاكتيك المشار إليها في حالة كونها منفردة او عند تنميتها سوية مع عزلتي بكتريا *S. pyogenes* فقد تبين انها كانت ذات تأثير فعال في خفض الاعداد الكلية لعزلتي بكتريا *S. pyogenes* وقد تم تثبيطها كلياً في حالة التنمية المشتركة لنوعي بكتريا حامض اللاكتيك معاً وكذلك تثبيط إنتاج الستربتولايسن O كلياً، اما عند تنمية النوع *Lb. acidophilus* لوحده فقد خفض انتاجية النوع *S. pyogenes* ليصل 0.3 وحدة من الستربتولايسن O/ مل.

ان اختبار التركيز المثبط الادنى (MIC) لكل من النواتج الايضية لنوعي بكتريا حامض اللاكتيك بصورة منفردة او سوية عند اضافتها الى وسط تنمية *S. pyogenes* ادى الى زيادة تثبيط النمو من خلال تقليل الاعداد الكلية لعزلتي بكتريا *S. pyogenes* وكذلك تثبيط إنتاج الستربتولايسن O منها مع زيادة التراكيز المضافة من 10، 20 أو 40 ، 60 ، 120 ملغم/ مل وقد حصل التثبيط الكلي عند التركيز 40 ملغم/ مل من نوعي البكتريا سواء كانت بصورة منفردة او سوية الى وسط التنمية وقد حصل الحال نفسه عند اختبار التراكيز 25 ، 50 و 100 ، 200 و 400 ملغم/100مل من المستخلصات المائية وكان التركيز المثبط الكلي عند 200 ملغم / 100مل من كل من بذور الحبة السوداء وبذور الكلغان واوراق الشاي الاخضر.

ان اختبار القدرة التثبيطية باستخدام تقنية الحفر (Wells) للنواتج الايضية لكلا نوعي بكتريا حامض اللاكتيك بصورة منفردة او سوية والمستخلصات النباتية من بذور الحبة السوداء وبذور الكلغان واوراق الشاي الاخضر، تبين ان التركيز 40 ملغم/مل من النواتج الايضية كانت قابليته التثبيطية بين 16.4- 22.3 ملم اما التركيز 100 ملغم/ 100مل من المستخلصات النباتية فكان ذو قابلية تثبيطية بين 21.6- 26.3 ملم والتي تبين انها ذات فعالية عالية في تثبيط عزلتي بكتريا *S. pyogenes*.

ABSTRACT

This study was carried out at the department of Biology Laboratories, College of Education, University of Tikrit for the period between 01/07/2009 to 01/05/2010, to aimed at isolation and diagnosing two isolates from *Streptococcus pyogenes* and investigation the effects of some factures in growth rate and hemolysin O production , also isolation and diagnosing each of *lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*, furthermore, two show the effects of aqueous extraction from each *Nagella sativa*, Kelgan seeds and Green tea leaves or cell suspension or metabolites for each species lactic acid bacteria species on *S. pyogenes* isolates or 2 on growth rate and hemolysin O production.

The results were found that capable to isolate two isolates *S. pyogenes* from the patients infections with pharyngitis after carried out the morphological , cultural and biochemical tests. Also isolated each *lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* depended at the above mention objects, furthermore to diagnosis the active compounds in aqueous extraction for each *Nigella sativa* and kelgan seeds and green tea leaves which were contained Ratingen, Sapons, Alkaloids, Tannins, Glycosides, Phosphors and Coumarins in kelgan seeds, white the *Nagella sativa* seeds and green tea leaves extracts were not contains each Alkaloids and Tannins.

The results also conducted the optimal environments for cultivation *S. pyogenes* isolates and hemolysin O production was at $35C^0$ which the total counts at 4. 3×10^8 CFU/ml and 1. 5 units/ml respectively and at pH 6. 5 or 7. 5 and 2. 5 mg of Fe_2O_3 / ml in cultural media. Also the effect of interaction between tow spice at lactic acid bacteria which mention above when in

single or I combination cultivation cases with tow strains of *S. pyogenes,* the results indicated that have been a highly effects on total counts for each *S. pyogenes* isolates 1 or 2 and it was completed growth inhibition and hemolysin O produce when the lactic acid bacteria were cultivation in combination, except at interaction with *L. acidophilus* alone, which appear that *S. pyogenes* was capable to produce 0. 3 unit from hemolysin O/ml.

The used of metabolic production from each tow species of lactic acid bacteria when addition to cultural media *S. pyogenes* in alone or in combination to caused growth inhibition through reduced each of the *S. pyogenes* total counts, and hemolysion O produced with increased the additive concentration from 10, 20 and 40 mg/ml and the completed inhibition was done with 40 mg/ml from each strains of LAB singly or in combination also obtained the same case when used the 25, 50 and 100mg/ ml from aqueous extracts from each *Nagella sativa* and Kelgan seeds and Green tea leaves.

The inhibition effectiveness assay for metabolic production for each species of lactic acid bacteria singly of in combination and the aqueous plant extracts from *Nagella sativa* and Kelgon seeds and green tea leaves. There were found the 40 mg from metabolic compounds of LAB was inhibition capabilities between 16. 4 to 22. 3 mm while the 100 mg/100 ml from each plant extracts have inhibition capabilities between 21. 6 to 26. 3 mm and appear that a high activity in tow *S. pyogenes* strains inhibition.

دور بعض المعززات العلاجية والمستخلصات النباتية في التثبيط البكتيري



9789957327415



دار الحامد للنشر والتوزيع
الأردن - عمان- ص.ب.: 366 عمان 11941 الأردن
هاتف: 5231081 فاكس: 5235594-009626
E-mail: dar_alhamed@hotmail.com
daralhamed@yahoo.com
www.daralhamed.net